



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Pharmacologie*

Présentée et soutenue par *Chartrain Marine*
Le *18 novembre 2011*

Titre : *IMPLICATION DES CELLULES EXPRIMANT LE TRANSPORTEUR ABCB5 DANS LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME METASTATIQUE*

JURY

Lionel LARUE, Directeur de recherche à l'UMR3347, Institut Curie
Pierre CUQ, Professeur à l'université de Montpellier
Gergely SZAKACS, Group leader, Laboratory of Membrane Proteins, Hungarian Academy of Sciences
Caroline ROBERT, Chef du département de Dermatologie à l'Institut Gustave Roussy
Jean Edouard GAIRIN, Professeur à l'université de Toulouse
Nicolas GUILBAUD, Directeur du Centre de Recherche en Oncologie (CROE), Pierre Fabre

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologie*
Unité de recherche : *CROE et USR3388 CNRS-Pierre Fabre*
Directeur(s) de Thèse : *Jean Edouard Gairin et Nicolas Guilbaud*
Rapporteurs : *Lionel LARUE ; Pierre CUQ ; Gergely SZAKACS*

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait pas été la même sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes. Je tiens donc à remercier ici l'ensemble de mon jury, de mes encadrants, collègues et amis ayant contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail.

*Je souhaite tout d'abord remercier **M. Lionel Larue**, **M. Pierre Cuq** et **M. Gergely Szakacs** pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit ainsi que **Mme C. Robert** pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de juger mon travail.*

*Je souhaite également adresser un grand merci à **Nicolas Guilbaud** et **Jean-Edouard Gairin** pour avoir assuré la direction de ma thèse. Merci de m'avoir accueilli dans vos équipes respectives et d'avoir su me faire profiter de votre expérience tout en me laissant construire la mienne. J'espère avoir été la hauteur de la confiance que vous m'avez accordée.*

*Je tiens à remercier très sincèrement **Joëlle Riond** et **Jean-Philippe Annereau** pour leur encadrement. Merci de m'avoir transmis avec patience et bonne humeur toutes les connaissances qui font aujourd'hui ma richesse. Jean-Philippe, merci pour toutes les discussions scientifiques que tu as partagées avec moi et pour tes anecdotes souvent improbables qui ont égayé nos réunions et notre périple à Viennes. Joëlle, comment te remercier pour tout ce que tu m'as apporté. Merci de m'avoir initié à la cytométrie en flux et d'avoir consacré autant de temps et d'énergie à mon encadrement expérimental et à la rédaction de la publication. Ta disponibilité, ton aide et ta complicité de tous les instants m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Je te suis également infiniment reconnaissante d'avoir pris le temps de me guider autant scientifiquement que personnellement.*

*J'adresse également un merci tout particulier à **Aline Stennevin** pour avoir cru comme moi au projet ABCB5 et pour avoir contribué à sa réussite! Merci pour ton soutien inconditionnel et ton aide à la paillasse. Je suis heureuse d'avoir partagé avec toi les hauts et les bas de ce projet et j'espère que par delà ma thèse tu continueras à le faire vivre. Bonne chance avec ABCB5 : une protéine quelque peu capricieuse mais tellement passionnante!*

*Je tiens également à remercier **N. Meyer** et **L. Lamant** pour avoir rendu possible la consécration de ce projet grâce à des échantillons de patients.*

*Merci à toute l'équipe de l'UMR2587 qui m'a accueillie et si vite intégrée à mes débuts. La convivialité si précieuse qui vous caractérise tous m'a entourée pendant deux superbes années. Merci d'avoir partagé avec moi toutes ces boîtes de bonbons Haribot! **Aude**, merci pour ta joie de vivre communicative. **Anaïs**, merci d'avoir été ma coloc dans le bureau des pouponnettes. **Bibi**, **Chantal**, merci de m'avoir fait profiter de votre expérience et de vos conseils. Une pensée pour **Marie-Hélène**, spécialiste biochimie qui a pris le temps de se pencher sur mes problèmes de Western Blot. Merci à **Cécile**, **Delphine**, **Laurence**, **Vanessa**, **William**, **Fred**, **Latifa**, **William** et **Myriam** pour avoir contribué par leur sourire à cette atmosphère si chaleureuse, gourmande et*

*scientifiquement stimulante de l'UMR. Merci également à **Marion** pour avoir partagé avec enthousiasme un petit bout de l'aventure ABCB5. Enfin, un merci tout particulier à **Nico** et **Aurélie** pour avoir continué à me supporter une année supplémentaire en partageant mes doutes et en m'aidant à rester optimiste.*

*Merci également à toute l'équipe du CROE, un service où la gentillesse et la complicité sont également de rigueur. Merci à **Laurence** pour son aide lors des tris cellulaires. Merci à **Bruno, Isabelle, Sabine, Caroline, Valérie, Lydia** et **Sandrine** qui m'ont permis de réaliser l'étude in vivo de mon projet. Merci à **Jérôme** pour m'avoir assisté dans mes débuts en PCR quantitative et à **Stephane** pour les Western Blot. Merci à **Marie-Laure, Vanessa, Karine, Caroline, Jérôme F., Nathalie, Fabien** et **Roselyne** pour votre bonne humeur. **Coline** et **Claire**, merci pour vos folles aventures qui ont égayé la salle de culture. La bonne entente au sein de ce service a plus que participé à mon moral durant la dernière (mais pas la moindre) année.*

*Je tenais également à remercier mes amis qui m'ont si souvent permise de décompresser et qui m'ont apporté un soutien sans faille. **Marie, Caro** et **Marjorie**, merci pour vos petits et parfois très longs mails qui ont rythmé ma thèse. Malgré la distance et les années, notre amitié est un des piliers de ma vie. **JB, Estelle** et **Olive** merci pour votre amitié si précieuse à mes yeux. **JB** merci aussi pour nos séances de footing, irremplaçable soupape de décompression...**Alicia, Luc, Sarah** et **Schpounz**, merci d'avoir été présents. **Alicia** ma binôme, **Schpounz** et ton titre de thèse inbitable, **Estelle** et tes fermentations interminables, nous avons partagé les doutes et le stress de la thèse et l'année 2011 marquera notre réussite à tous! **Fanny, Mathieu, Oriane, Benoît** et **Claire**, merci pour vos conseils éclairés sur la thèse. Vous avez été pour moi de sacrés exemples que je n'ai eu de cesse de suivre et d'égaler au cours de ces trois ans.*

*Un grand merci du fond du cœur à ma famille. **Mes parents** et **mes sœurs** qui m'ont en toutes occasions apporté les moyens et le soutien sans limite nécessaires à l'accomplissement de ce long parcours d'étude supérieures. Merci à **ma famille de cœur en Dordogne** pour ses encouragements.*

*Enfin, un immense merci à **Mica** pour m'avoir supportée (souvent dans les deux sens du terme) pendant ces trois années. Ta seule présence m'a permis de relativiser et surmonter tous les moments difficiles et je sais que se sera toujours le cas. Tu m'as épousée pour le meilleur et pour le pire... le pire est maintenant presque passé...alors maintenant profitons du meilleur!*

RESUME

Bien qu'au 8ème rang des cancers les plus fréquents, le mélanome est un problème médical majeur car son incidence double tous les dix ans chez les populations occidentales. Cette pathologie, au stade métastatique, est réfractaire à la chimiothérapie avec moins de 20% de réponses objectives sans amélioration du temps de survie pour le traitement de référence : la dacarbazine. Même si des thérapies ciblées prometteuses sont développées avec l'ipilimumab (inhibiteur de CTL-A4) ou le vemurafenib (inhibiteur de BRAF), la chimiorésistance reste au centre des préoccupations. Récemment, des sous-populations cellulaires présentant des caractéristiques particulières en termes d'agressivité tumorale ont été mises en évidence dans le mélanome. Parmi elles, les cellules exprimant ABCB5 ont été définies comme "Cellules Initiatrices de Mélanome" pour leur capacité à régénérer des tumeurs chez l'animal. ABCB5 appartient à la famille des transporteurs ABC (pour ATP-Binding Cassette) qui permettent l'efflux de nombreux composés de façon ATP-dépendante et qui sont largement impliqués dans la chimiorésistance des cancers. Dans ce contexte, j'ai étudié l'implication d'ABCB5 dans les phénomènes de chimiorésistance du mélanome métastatique.

Dans un premier temps, j'ai analysé la résistance globale de plusieurs modèles *in vitro* de mélanome en relation avec plusieurs transporteurs ABC dont ABCB5. Ces modèles ne permettant pas une modélisation satisfaisante de la chimiorésistance, je me suis intéressée à la résistance de sous-populations cellulaires. J'ai ainsi confirmé que la protéine ABCB5 est exprimée sous forme d'une sous-population minoritaire au sein de plusieurs modèles *in vitro* de mélanome et j'ai mis en place une technique expérimentale permettant d'évaluer l'impact de substances anti-mélanome sur ces cellules.

J'ai montré dans un modèle de xénogreffe WM-266-4 que le traitement par le temozolomide aboutit *in vivo* à l'enrichissement de la sous-population exprimant ABCB5 et ce, malgré une régression des tumeurs. Par la même approche transposée *in vitro*, j'ai montré que les cellules exprimant ABCB5 survivent à la dacarbazine, à des doses pharmacologiquement actives. Cette observation a également été étendue à d'autres composés cytotoxiques et notamment aux agents de thérapies ciblées actuellement testés pour le traitement du mélanome. Par ailleurs, mes résultats indiquent que les cellules de mélanome peuvent moduler l'expression de la protéine ABCB5 en réponse à un stress pharmacologique. Cette étude montre l'intérêt de la protéine ABCB5 en tant que marqueur d'une sous-population cellulaire caractérisée par une résistance accrue. Néanmoins, un rôle fonctionnel direct d'ABCB5 dans ce phénotype reste à démontrer. Cette question a été abordée par la mise en place de modèle de surexpression d'ABCB5 au sein de l'équipe ainsi que par des approches d'extinction par siRNA mais les premiers résultats indiquent qu'il est difficile d'étayer l'hypothèse d'un rôle actif pour ABCB5. Il est donc aujourd'hui primordial de statuer sur le rôle de cette protéine et de déterminer son importance dans le processus de chimiorésistance du mélanome.

L'ensemble de ce travail ouvre de nouvelles perspectives pour la recherche de cibles pharmacologiques innovantes dans le contexte du mélanome métastatique.

ABSTRACT

Melanoma is one of the most aggressive form of skin cancer and its incidence is increasing worldwide. Metastatic melanoma is highly resistant to conventional chemotherapies and dacarbazine, the reference treatment has a very low response rate (<20%) without impact on overall survival. A number of promising targeted therapies have been developed recently such as ipilimumab (an anti-CTL-A4 antibody) or vemurafenib (a specific inhibitor of BRAF) but resistance invariably develops and still remains an unsolved question. Recently, relevant markers have been identified to select a restricted sub-population of melanoma cells with particular stem cell-like properties. Among them, ABCB5 expressing cells have been defined as "Melanoma initiating cells" since they display an enhanced tumorigenicity in mice. As a member of the ABC (ATP-Binding Cassette) transporters family, ABCB5 is thought to participate to the melanoma chemoresistance through a function of efflux. Here, we have studied the participation of ABCB5 expressing cells to chemoresistance in metastatic melanoma.

We first investigated *in vitro* models of melanoma for their ability to mimic global resistance, in relation with their ABC transporters expression. We then focused our study on the resistance of minor sub-populations. We confirmed that ABCB5 is expressed at the surface of a sub-population and we developed an experimental procedure to monitor this sub-population upon chemotherapeutic treatment.

Using the WM-266-4 melanoma xenograft model, we demonstrated *in vivo* that ABCB5-expressing cells are enriched after a temozolomide treatment despite a significant tumor regression. We then monitored *in vitro* the evolution of the ABCB5-expressing cell sub-population upon pharmacologically active doses of dacarbazine. This observation has been extended to various chemotherapeutic drugs including the new targeted therapy developed in melanoma. We also demonstrated that melanoma cells are able to modulate ABCB5 expression upon pharmacological treatment. Taken together, our findings show that ABCB5-expressing cells are more resistant to the anti-melanoma chemotherapeutic drugs than cells of the tumor bulk. Nevertheless, a functional property of ABCB5 protein remains unclear in this phenotype. The question was addressed by using cellular model which stably overexpressed ABCB5 and by performing siRNA extinction experiments. Our data failed to show any functional evidence that ABCB5 can confer a selective advantage to melanoma cell. This remains a determining question we need in order to answer to establish the importance of ABCB5 in melanoma chemoresistance.

Our results may be of particular importance in determining the clinical outcome of chemotherapeutic treatments and reinforce the interest of ABCB5 and ABCB5-expressing cells as potential therapeutic targets in melanoma.

SOMMAIRE

RESUME	1
ABSTRACT	2
SOMMAIRE.....	3
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
AVANT PROPOS.....	10
LE MELANOME : UN DEFI THERAPEUTIQUE	11
1 LE MELANOME : UNE QUESTION DE SANTE PUBLIQUE.....	11
1.1 <i>Le mélanome est le plus agressif des cancers de la peau.....</i>	11
1.2 <i>Le mélanome est une pathologie des populations caucasiennes.....</i>	12
1.2.1 Les facteurs de risque intrinsèques	12
1.2.2 Les facteurs de risque environnementaux	13
1.2.3 Epidémiologie du mélanome	13
1.3 <i>Les différents types de mélanome</i>	14
2 LA PHYSIOPATHOLOGIE DU MELANOME.....	15
2.1 <i>Le développement normal des mélanocytes</i>	15
2.1.1 Les mélanocytes sont des cellules différenciées.....	15
2.1.2 Les mélanocytes sont issus de la crête neurale	15
2.1.3 Les mélanocytes et cellules souches adultes de mélanocytes	16
2.2 <i>La physiopathologie cellulaire.....</i>	17
2.2.1 Le modèle linéaire classique	17
2.2.2 Le modèle des cellules souches cancéreuses	18
2.3 <i>La physiopathologie moléculaire</i>	19
2.3.1 Le passage d'un nævus à un mélanome primaire.....	19
2.3.2 Invasion du derme et des vaisseaux sanguins et lymphatiques	21
3 LES MODELES D'ETUDE <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> DU MELANOME.....	23
3.1 <i>La culture de lignées cellulaires de mélanome.....</i>	23
3.1.1 La culture en mono couche adhérente	23
3.1.2 Les modèle de culture en trois dimensions de cellules de mélanome.....	23
3.1.3 Les co-cultures et les modèles de peau reconstruites	24
3.2 <i>Les modèles de xénogreffes chez la souris.....</i>	24
3.2.1 Les différents modèles de souris	24
3.2.2 Les modèles syngéniques	25
3.3 <i>Les animaux transgéniques.....</i>	26
3.3.1 Les souris transgéniques.....	26
3.3.2 Les poissons zèbres transgéniques	26
4 LES TRAITEMENTS ACTUELS/DISPONIBLES DU MELANOME METASTATIQUE.....	27
4.1 <i>Le pronostic d'un mélanome dépend de la dissémination métastatique</i>	27
4.2 <i>Les traitements par chirurgie.....</i>	29
4.3 <i>Les traitements par radiothérapie</i>	29
4.4 <i>Les immunothérapies sont utilisées pour les mélanomes de stade II et III.....</i>	30
4.4.1 L'interféron alpha 2b (IFN)	30

4.4.2	L'interleukine 2 (IL-2)	30
4.4.3	Les anticorps monoclonaux anti-CTLA4	31
4.5	<i>La chimiothérapie classique est utilisée pour les mélanomes de stades IV</i>	32
4.5.1	La dacarbazine (<i>Déticène®</i>)	32
4.5.2	Le temozolomide (<i>témodal®</i>)	33
4.5.3	Les dérivés nitroso-urées	34
4.5.4	Les polychimiothérapies	34
4.6	<i>Les thérapies ciblées : l'avenir des traitements anti-mélanome</i>	35
4.6.1	Les inhibiteurs de la voie PI3K/AKT	35
4.6.2	Les inhibiteurs de récepteurs à tyrosine kinase	35
4.6.3	Les inhibiteurs de RAS	35
4.6.4	Les inhibiteurs de RAF	36
4.6.5	Les inhibiteurs de MEK	37

LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME METASTATIQUE : MECANISMES

CELLULAIRES ET MOLECULAIRES 39

1	LES DIFFERENTES VOIES IDENTIFIEES DANS LA RESISTANCE DU MELANOME.....	40
1.1	<i>Les voies de réparation de l'ADN permettent de résister aux agents alkylants</i> ...	40
1.1.1	Voie de la réversion directe par la MGMT	40
1.1.2	Autres voies de réparation de l'ADN impliquées dans la chimiorésistance.....	41
1.2	<i>L'altération de la sensibilité à l'apoptose est particulièrement importante dans le mélanome</i>	41
1.3	<i>La voie de la mélanogenèse est un mécanisme de résistance spécifique au mélanome</i>	42
1.3.1	La voie de la mélanogenèse permet la synthèse de la mélanine	42
1.3.2	La voie de la mélanogenèse est impliquée dans la chimiorésistance	43
2	LES TRANSPORTEURS ABC : UN ROLE ENCORE CONTROVERSE DANS LA RESISTANCE DU MELANOME	45
2.1	<i>Les transporteurs ABC : généralités et fonctionnement</i>	45
2.1.1	La famille des protéines ABC.....	45
2.1.2	Modèle des structures secondaires et tertiaires des transporteurs ABC	46
2.1.3	Modèle de fonctionnement dynamique de la pompe	47
2.1.4	Les protéines ABC ont des rôles physiologiques très diversifiés	49
2.2	<i>Les transporteurs ABC protègent les cellules saines de façon constitutive</i>	50
2.2.1	Les transporteurs ABC sont présents pour protéger les tissus sensibles de l'organisme	50
2.2.2	Les transporteurs ABC protègent l'organisme d'une grande variété de nocifs environnementaux	52
2.3	<i>Les transporteurs ABC contribuent à la chimiorésistance</i>	52
2.3.1	Les transporteurs de la famille ABCB	53
2.3.2	Les transporteurs de la famille ABCC	54
2.3.3	ABCG2.....	57
2.3.4	Les transporteurs de la famille ABCA	57
2.4	<i>Les transporteurs ABC : des cibles pharmacologiques ?</i>	58

LE MODELE DES CELLULES RESISTANTES INITIATRICES DE MELANOME

(CRIM) : UN NOUVEAU CONCEPT POUR EXPLIQUER LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME 61

1	PRESENTATION DU MODELE DES CELLULES CRIM.....	61
1.1	<i>Identification des cellules CRIM</i>	62
1.1.1	Identification de cellules CRIM à partir de marqueurs membranaires	62
1.1.2	Identification de cellules CRIM à partir de culture 3D <i>in vitro</i>	64
1.1.3	Identification d'une « Side Population » enrichie en cellules CRIM.....	65

1.2	<i>Le modèle des cellules CRIM permet d'apporter une explication à la chimiorésistance.....</i>	67
2	ABCB5 ET LE MELANOME METASTATIQUE : DONNEES SUR L'AGRESSIVITE ET LA CHIMIORESISTANCE.....	68
2.1	<i>ABCB5 : un transporteur à la structure encore controversée.....</i>	68
2.2	<i>ABCB5 : marqueur d'agressivité spécifique du mélanome.....</i>	70
2.2.1	ABCB5 est exprimé préférentiellement dans les lignées mélanocytaires.....	70
2.2.2	L'expression d'ABCB5 est corrélée au développement du mélanome	71
2.3	<i>ABCB5 : marqueur de cellules CRIM ?.....</i>	71
2.3.1	Les cellules exprimant ABCB5 sont-elles des cellules CRIM ?	71
2.3.2	Les cellules exprimant ABCB5 au sein du micro-environnement tumoral	73
2.4	<i>ABCB5 : acteur de la chimiorésistance du mélanome ?.....</i>	74
2.4.1	ABCB5 : des indices de son implication dans la chimiorésistance	74
2.4.2	La protéine ABCB5 est-elle une pompe d'efflux fonctionnelle ?	74
2.4.3	La protéine ABCB5 est-elle impliquée dans la résistance de cancers autres que mélanomes ?.....	75
	OBJECTIFS DE LA THESE.....	77
	RESULTATS	78
	MODELISATION DE LA RESISTANCE DANS DES MODELES <i>IN VITRO</i> DE MELANOMES	79
1	PRESENTATION DES DIFFERENTS MODELES <i>IN VITRO</i> DE MELANOME.....	79
1.1	<i>Description du panel de lignées de mélanome</i>	79
1.2	<i>Description du modèle mélanosphères</i>	79
2	CARACTERISATION DE LA RESISTANCE GLOBALE DES DIFFERENTS MODELES <i>IN VITRO</i> DE MELANOME.....	81
2.1	<i>Les lignées de mélanomes in vitro ne reflètent pas la chimiorésistance du mélanome</i>	81
2.2	<i>Le modèle des mélanosphères est plus représentatif de la chimiorésistance du mélanome métastatique que les cellules en monocouche.....</i>	81
3	CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC DANS LES DIFFERENTS MODELES <i>IN VITRO</i> DE MELANOME.....	82
3.1	<i>Caractérisation de l'expression des transporteurs ABC dans les lignées de mélanome</i>	83
3.2	<i>Caractérisation de l'expression d'ABCB5.....</i>	83
3.3	<i>Caractérisation du modèle des mélanosphères et de l'expression des transporteurs ABC.....</i>	85
	ABCB5 PERMET DE MARQUER UNE SOUS-POPULATION CELLULAIRE POSSEDANT UN AVANTAGE DE SURVIE FACE A LA CHIMIOOTHERAPIE CLASSIQUE	87
1	ABCB5 EST EXPRIME A LA SURFACE D'UNE SOUS-POPULATION DES LIGNEES DE MELANOMES	87
2	CHEZ LA SOURIS, LE TRAITEMENT D'UNE TUMEUR DE MELANOME PAR LE TEMOZOLOMIDE ENTRAINE UN ENRICHISSEMENT EN CELLULES EXPRIMANT ABCB5....	90
3	<i>IN VITRO</i>, UNE AUGMENTATION DU POURCENTAGE DE CELLULES EXPRIMANT ABCB5 EST OBSERVEE APRES TRAITEMENT PAR DIFFERENTS AGENTS DE CHIMIOOTHERAPIE.....	91

3.1	<i>La dacarbazine ainsi que divers agents de chimiothérapie entraînent un enrichissement en cellules exprimant ABCB5 au sein d'une population de cellules de mélanome</i>	91
3.2	<i>ABCB5 est le seul transporteur ABC impliqué dans le phénotype observé.</i>	93
3.3	<i>Le traitement à des agents anticancéreux de chimiothérapie classique entraîne une survie sélective des cellules exprimant ABCB5</i>	94
4	ETUDE PRELIMINAIRE SUR DES ECHANTILLONS CLINIQUES	96
4.1	<i>Description des patients.....</i>	96
4.2	<i>Expression d'ABCB5 avec ou sans traitement dans les échantillons cliniques.....</i>	96
	LA PROTEINE ABCB5 EST IMPLIQUEE DIRECTEMENT OU INDIRECTEMENT DANS LE PHENOTYPE DE CHIMIORESISTANCE DU MELANOME	98
1	L'EXPRESSION D'ABCB5 EST REGULEE FACE AU TRAITEMENT PAR DES AGENTS DE CHIMIOTHERAPIE CLASSIQUE.....	98
1.1	<i>L'expression d'ABCB5 est induite suite à un traitement par des agents de chimiothérapie.....</i>	98
1.2	<i>La protéine ABCB5 est mobilisée à la membrane plasmique en réponse au traitement</i>	99
2	LES CELLULES ABCB5 SONT SELECTIONNEES EN REPOSE AU TRAITEMENT PAR CHIMIOTHERAPIE.....	101
2.1	<i>Les cellules exprimant ABCB5 résistent et prolifèrent après traitement par des agents de chimiothérapie</i>	101
2.2	<i>Le tri cellulaire ne nous permet pas de conclure quant à l'avantage de survie des cellules exprimant ABCB5.....</i>	102
3	ABCB5 A-T-IL UN ROLE FONCTIONNEL DANS LA RESISTANCE DU MELANOME ? ..	103
3.1	<i>Extinction siRNA</i>	104
3.2	<i>Sur-expression transitoire d'ABCB5 isoforme 2.....</i>	104
3.3	<i>Sur-expression stable d'ABCB5 isoforme 2</i>	104
	ABCB5 EST UN MARQUEUR DE LA RESISTANCE A LA NOUVELLE GENERATION DE MOLECULES ANTI-MELANOMES	106
1	EVALUATION DU VEMURAFENIB SUR LES LIGNEES DE MELANOME <i>IN VITRO</i>	106
1.1	<i>Les cellules exprimant ABCB5 survivent préférentiellement à un traitement par le vemurafenib.....</i>	107
1.2	<i>Le traitement au vemurafenib entraîne une production de mélanine dans les cellules de mélanome</i>	107
2	EVALUATION DU VEMURAFENIB SUR DES TUMEURS DE PATIENTS <i>EX VIVO</i>.....	108
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	109
	LES MODELES <i>IN VITRO</i> POUR L'ETUDE DE LA RESISTANCE DU MELANOME METASTATIQUE	110
1	LES LIGNEES CELLULAIRES ETABLIES DE MELANOME	111
2	LES MELANOSPHERES : UN NOUVEAU MODELE <i>IN VITRO</i> DU MELANOME.....	112
2.1	<i>Les mélanosphères ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de la résistance du mélanome.....</i>	112
2.2	<i>La population CRIM est-elle enrichie dans les mélanosphères ?</i>	113
3	LA SOUS-POPULATION CRIM IDENTIFIEE ABCB5 POSSEDE-T-ELLE DES CARACTERISTIQUES DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES ?	115
	ABCB5 EST-IL IMPLIQUE DANS LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME ?... ..	119

1	LES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 SONT IMPLIQUEES DANS LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME	119
1.1	<i>Les cellules exprimant ABCB5 ont-elles un avantage de survie face aux thérapies anti-mélanome ?.....</i>	119
1.1	<i>Les cellules exprimant ABCB5 sont-elles induites face aux thérapies anti-mélanome ?.....</i>	121
2	LA PROTEINE ABCB5 EST-ELLE IMPLIQUEE DANS LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME ?	122
2.1	<i>ABCB5 a-t-il une fonction d'efflux dans le phénotype observé ?.....</i>	122
2.2	<i>Quelle isoforme pourrait être impliquée d'un point de vue structural ?.....</i>	123
2.3	<i>ABCB5 peut-il avoir un rôle fonctionnel autre que l'efflux ?.....</i>	124
2.4	<i>ABCB5 est-il un transporteur vésiculaire ?</i>	124
3	LE SUIVI DES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 PEUT-IL TROUVER DES APPLICATIONS EN CLINIQUE ?	127
3.1	<i>L'augmentation du nombre de cellules exprimant ABCB5 suite au traitement pharmacologique est-elle relevante de la situation clinique ?.....</i>	127
3.2	<i>La protéine ABCB5 peut-elle être utilisée comme marqueur de la résistance du mélanome ?.....</i>	128
	LA PROTEINE ABCB5 ET LES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 SONT-ELLES DES CIBLES PHARMACOLOGIQUES ?	129
1	PEUT-ON ENVISAGER DE CIBLER LE TRANSPORTEUR ABCB5 ?.....	130
2	PEUT-ON ENVISAGER DE CIBLER LES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 ?	131
3	COMMENT EXPLOITER ABCB5 ET LES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 EN TANT QUE CIBLE PHARMACOLOGIQUE POUR UNE STRATEGIE ANTI-MELANOME ?	132
	CONCLUSION GENERALE.....	134
	MATERIEL ET METHODES	135
1	BIOLOGIE CELLULAIRE.....	136
1.1	<i>La culture cellulaire.....</i>	136
1.1.1	Lignées cellulaires et conditions de culture	136
1.1.2	Culture des melanoshères	137
1.1.3	Traitements cytotoxiques	137
1.1.4	Suivi de la division cellulaire	137
1.2	<i>Cytotoxicité par la technique d'ATP-lite</i>	138
1.3	<i>Transfection stable du vecteur de sur-expression d'ABCB5.....</i>	138
1.4	<i>Transfection siRNA et vecteur d'expression ABCB5.....</i>	139
1.5	<i>Description des anticorps.....</i>	139
1.6	<i>Cytométrie en flux.....</i>	140
1.7	<i>Tri cellulaire.....</i>	140
1.8	<i>Western Blot.....</i>	141
1.9	<i>Immunofluorescence</i>	141
1.10	<i>Immunohistochimie</i>	141
2	ETUDES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	143
2.1	<i>Extraction des ARNs.....</i>	143
2.2	<i>Synthèse des cDNAs et PCR quantitative en temps réel.....</i>	143
2.3	<i>Gels ADN/ARN.....</i>	143
2.4	<i>Construction des vecteurs d'expression d'ABCB5 isoforme 2.....</i>	144
2.5	<i>Séquençage.....</i>	144
3	ETUDE <i>IN VIVO</i>	145

3.1	<i>Souris (provenance et condition d'élevage).....</i>	<i>145</i>
3.2	<i>Greffe sous-cutanée.....</i>	<i>145</i>
3.3	<i>Dissociation des tumeurs ex-vivo et co-marquage CD44.....</i>	<i>145</i>
4	ETUDE SUR LES PRELEVEMENTS DE PATIENTS	146
4.1	<i>Etude d'échantillons cliniques avant et après traitement.....</i>	<i>146</i>
4.2	<i>Etude ex vivo de prélèvements de patients.....</i>	<i>146</i>
5	ANALYSE STATISTIQUE.....	146
ABREVIATIONS		147
RÉFÉRENCES.....		149
ANNEXES.....		165

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

AVANT PROPOS

Le mélanome est le plus agressif et le plus dangereux des cancers de la peau et son incidence ne cesse d'augmenter depuis plusieurs décennies. Cette pathologie est donc devenue un enjeu sanitaire majeur pour les populations occidentales. Pourtant si le mélanome primaire est généralement de bon pronostic, une fois le stade métastatique atteint, aucune solution thérapeutique efficace n'est actuellement disponible. Des thérapies ciblées prometteuses sont tout de même développées telles que les inhibiteurs de BRAF. Cependant de nombreux cas de résistance à ces nouveaux composés sont déjà recensés. La chimiorésistance reste donc dans le cas du mélanome au centre des préoccupations. La chimiorésistance ainsi que l'agressivité tumorales ont récemment été associées à l'existence de sous-populations cellulaires caractérisées par l'expression de marqueurs membranaires tels que CD20, CD271, CD133 ou ABCB5. Mon projet de thèse s'est focalisé plus précisément sur les cellules de mélanome exprimant la protéine ABCB5 et décrites comme "Cellules Résistantes Initiatrices de Mélanome" (CRIM) pour leur capacité à régénérer des tumeurs chez l'animal. ABCB5 est préférentiellement exprimé par les mélanocytes sains et son expression est corrélée à la progression de la maladie dans les prélèvements cliniques de mélanome. Il appartient à la famille des transporteurs ABC qui permettent l'efflux de nombreux composés de façon ATP-dépendante et qui sont largement impliqués dans la chimiorésistance des cancers. Cependant son implication et son importance dans les phénomènes de chimiorésistance du mélanome métastatique ne sont pas encore élucidés.

Pour poser les bases bibliographiques de mon sujet, je présenterai dans l'introduction l'état des connaissances sur la physiopathologie du mélanome et les causes identifiées de la chimiorésistance de ce cancer en insistant sur le rôle des transporteurs de type ABC. Je définirai également le nouveau concept des cellules CRIM en détaillant les notions concernant le transporteur ABCB5 dans le cadre de ce modèle et plus largement dans l'agressivité et la chimiorésistance du mélanome.



Figure 1 : Les cancers de la peau

A. carcinome baso-cellulaire (tiré de Crowson 2006). **B.** carcinome spino-cellulaire (tiré de Neville et al. 2007). **C.** mélanome primaire cutané (tiré de Slominski et al. 2001).

LE MELANOME : UN DEFİ THERAPEUTIQUE

1 LE MELANOME : UNE QUESTION DE SANTE PUBLIQUE

1.1 Le mélanome est le plus agressif des cancers de la peau

Les cancers représentent la première cause de mortalité en France avec 30% des décès selon les chiffres de la Haute Autorité de Santé en 2004. Les cancers de la peau sont les plus fréquents. On peut classer les cancers de la peau en 3 catégories : le carcinome baso-cellulaire ou BCC (pour Basal Cell Carcinoma), le carcinome spinocellulaire ou épidermoïde aussi appelé SCC (pour Spinal/Squamous Cell Carcinoma) et le mélanome (figure 1). L'incidence des cancers de la peau (tous confondus) est de 80 à 90 000 nouveaux cas chaque année en France. Il faut noter que ces données sont certainement sous-estimées par le mode de comptabilisation en raison du caractère bénin de la plupart des cancers de la peau.

Le **carcinome baso-cellulaire** est un cancer des kératinocytes et représente 80% des cas de cancer de la peau. Sa progression est lente et il est généralement peu agressif puisque l'on compte très peu de métastases qui, lorsqu'elles existent, sont souvent liées à une tumeur primaire de taille et de profondeur importante.

Le **carcinome spinocellulaire ou épidermoïde** est également un cancer des kératinocytes qui représente 15 à 20% des cancers de la peau. Il est plus agressif que le carcinome baso-cellulaire mais reste rarement mortel avec seulement 2 à 10% de cas de métastases.

Le **mélanome** est un cancer des mélanocytes. Il représente 5 à 7% des cancers de la peau selon l'Organisation Mondiale de la Santé en 2009 et se classe au 12^{ème} rang des cancers les plus fréquents avec près de 200 000 nouveaux cas diagnostiqués par an dans le monde (selon les chiffres de "Globocan, International Agency for Research on Cancer"). En France la pathologie du mélanome représente 7 532 nouveaux cas par an en 2008. Le mélanome est le plus agressif et le plus dangereux des cancers de la peau puisqu'il représente 65% des décès dû à des cancers de la peau avec 1 509 décès par an en France en 2008 (Observatoire européen du cancer et pour revue Cummins et al. 2006).

1.2 Le mélanome est une pathologie des populations caucasiennes

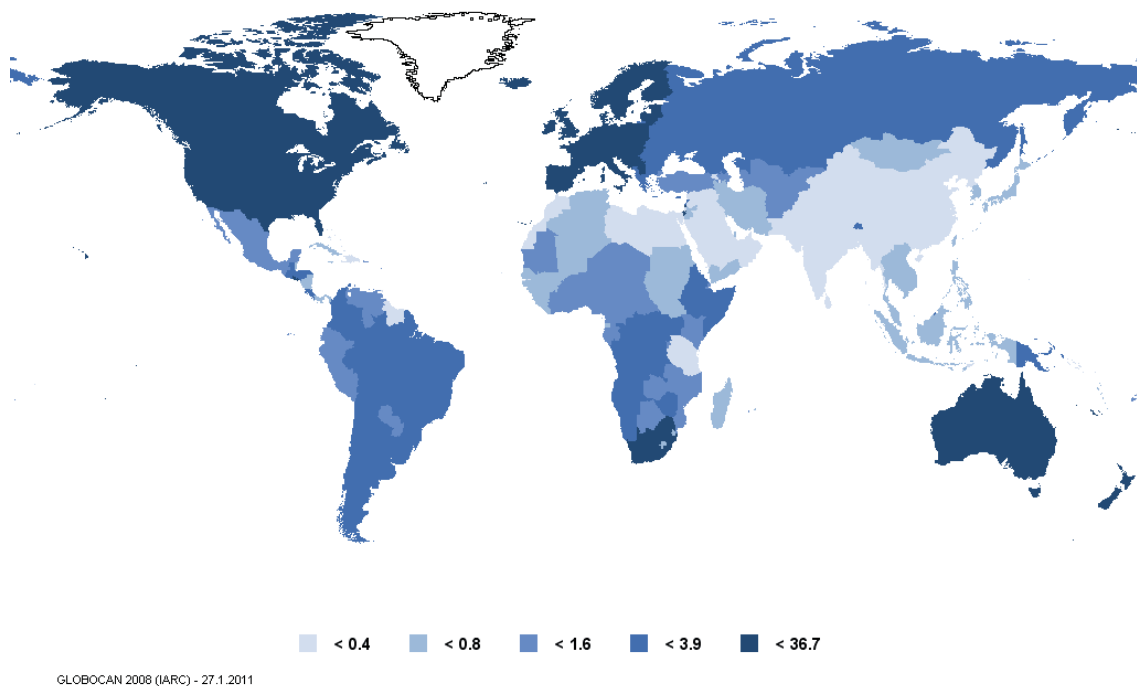
1.2.1 Les facteurs de risque intrinsèques

Le phototype définit la sensibilité de la peau aux rayonnements solaires. Il prend en compte la couleur de la peau, des yeux, des cheveux et la réaction de la peau face aux expositions solaires. Il existe 7 phototypes différents allant de l'albinisme (phototype 0) à une peau et des cheveux clairs (phototypes I, II et III) jusqu'à des peaux et des cheveux plus foncés (phototypes IV, V et VI). Un tableau des différents phototypes est présenté en annexe 1. Le phototype constitue un facteur de risque majeur. Plus le phototype est clair plus le risque de développer un mélanome est important (pour revue, Cummins et al. 2006).

La présence de grain de beauté (nævus) est également un facteur de risque. En effet, 36% des mélanomes se développent sur un nævus préexistant avec 43 % d'entre eux qui proviennent de nævi dysplasiques et 57% d'autres types de nævi (Bevona et al. 2003). Le nombre élevé de grains de beauté représente un facteur de risque pour le mélanome puisqu'un individu présentant plus de 100 nævi a 7,6 fois plus de risques de développer un mélanome qu'un individu en présentant moins de 10 (Garbe et al. 1994 et pour revue, Cummins et al. 2006).

Il existe également des familles dites « à risque » pour la pathologie du mélanome. En effet, 5 à 10% des mélanomes sont des formes familiales caractérisées par deux incidences sur trois générations (pour revue, Cummins et al. 2006). Un individu dont un parent de premier degré a été diagnostiqué pour un mélanome a 50% de risques supplémentaires de développer la maladie par rapport à un individu n'ayant aucun historique familial (Olsen et al. 2010). Le développement de mélanomes chez ces sujets est précoce et les tumeurs sont souvent multiples. Les familles dites "à risque" pour le mélanome présentent des mutations héréditaires sur certains gènes (figure 2). C'est notamment le cas du locus de *CDKN2A* codant pour deux protéines suppresseur de tumeur (p16/INK4a et p14/ARF) et intervenant dans la régulation du cycle cellulaire. Ce locus est muté dans 25 à 50% des cas de mélanomes familiaux. De plus, les souris transgéniques présentant une délétion du locus *Cdkn2a* et n'exprimant pas les protéines *Ink4a* et *Arf* développent spontanément des mélanomes cutanés en combinaison avec une activation de *hras* dans leur mélanocytes (pour revue, Chin 2003). Les gènes *CDK4* et *RBI* sont également à hauts risques et les souris transgéniques comportant une mutation de *Cdk4* présentent un taux de mélanome plus important après expositions à des agents carcinogènes (pour revue, Chin 2003). La mutation du gène *MC1R*,

A.



B.

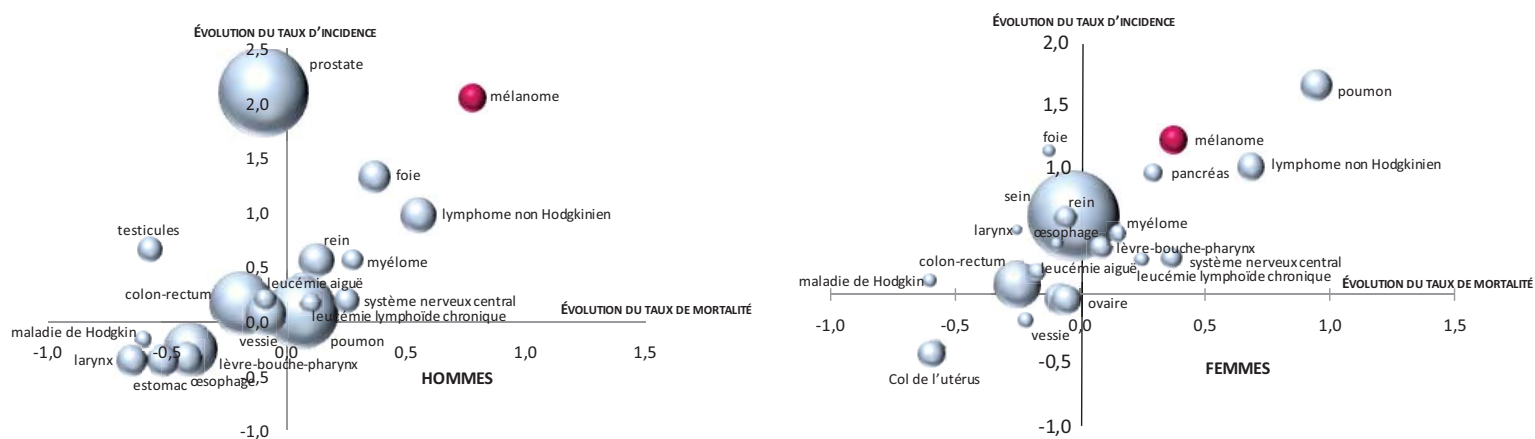


Figure 3 : épidémiologie du mélanome

A. La répartition au niveau mondial témoigne de l'importance du phototype dans le développement du mélanome avec des pays occidentaux de faible phototype particulièrement touchés et des populations asiatiques ou africaines de phototype plus important qui connaissent une incidence plus faible. La carte du monde indique la répartition de l'incidence du mélanome au niveau mondial. Les valeurs sont exprimées en taux de risque annuel pour 100 000 personnes et sont standardisées par rapport à l'âge des populations. (tiré de Globocan 2008, International Agency for Research on Cancer)

B. Evolution de l'incidence et de la mortalité des cancers entre 1980 et 2000 pour les hommes (graphique de gauche) et pour les femmes (graphique de droite) d'après les chiffres de l'INVS (Institut National de Veille Sanitaire). La taille des points correspond à l'incidence en 2000 et le mélanome apparaît en rouge.

codant pour un récepteur membranaire de la mélanocortine et impliqué dans la régulation de la couleur de la peau, augmente également le risque de mélanome (pour revue Nelson et al. 2009).

1.2.2 Les facteurs de risque environnementaux

L'exposition au soleil et plus largement aux rayonnements ultraviolets joue un rôle déterminant dans la progression de la maladie et on estime que 65 à 95% des mélanomes sont causés par une exposition solaire. L'exposition solaire durant l'enfance est notamment incriminée puisqu'elle représente 50 à 80% des dégâts solaires encourus sur l'ensemble de la vie. L'exposition solaire provoque, chez les enfants, le développement de nævi pigmentaires qui sont des facteurs de risque pour le mélanome (Armstrong et al. 2001).

1.2.3 Epidémiologie du mélanome

La combinaison de ces différents facteurs de risque conduit à une répartition très inégale des cas de mélanomes. Ainsi les populations de type caucasien sont de loin les plus touchées par la pathologie du mélanome par leur sensibilité aux expositions solaires et dans certains cas par des pré-dispositions génétiques.

L'Australie est le pays du monde le plus touché par la pathologie du mélanome. La raison principale est le phototype particulièrement à risque de ses populations associé à une forte exposition solaire. Au contraire, l'Afrique et l'Amérique latine et à plus forte raison l'Asie sont des pays où l'incidence du mélanome est très faible en raison du phototype peu à risque des populations (figure 3 A.) (Globocan, International Agency for Research on Cancer).

En règle générale, les populations occidentales présentent une incidence relativement élevée. Alors que la plupart des cancers connaissent aujourd'hui une stabilisation de leur incidence avec pour certains une régression de leur mortalité, le mélanome quant à lui continu de progresser depuis plus de 30 ans et son incidence double tous les dix ans pour les populations occidentales sans diminution du taux de mortalité. Ainsi, en France, le mélanome est le cancer progressant le plus en incidence et en mortalité (figure 3 B.). Cette augmentation est très certainement le reflet de la modification du comportement des individus à risque face à l'exposition solaire.

1.3 Les différents types de mélanome

Il existe plusieurs types de mélanome classés selon leur agressivité, la zone et les causes d'apparitions (pour revues, Porras et al. 1997 ; Cummins et al. 2006 ; Scolyer et al. 2011).

Le **mélanome superficiel extensif** ou SSM (pour Superficial Spreading Melanoma) est la forme la plus commune de mélanome des populations caucasiennes puisqu'elle correspond à plus de 70 à 80% des cas détectés. Son développement est souvent lié à des épisodes répétés de coups de soleil et intervient dans une moyenne d'âge de 50 ans. Il se localise préférentiellement au niveau du dos chez les hommes et des jambes chez les femmes.

Le **mélanome nodulaire** est la forme de mélanomes la plus agressive. Il présente une croissance rapide et progresse en profondeur avec très peu de croissance radiale (pas de gros diamètre). Il peut donc être difficile à diagnostiquer mais des signes tels que l'ulcération et le saignement sont très caractéristiques. Il représente 10 à 20 % des mélanomes des populations caucasiennes et de 70 ans de moyenne.

Le **mélanome de Dubreuilh** ou LMM (pour Lentigo Malignant Melanoma) est une forme de mélanome spécifique des personnes âgées (moyenne d'âge de 80 ans) et des zones de grande exposition au soleil (visage ou avant-bras). Il s'agit d'une des formes les plus rares de mélanome puisqu'elle représente 5% des mélanomes. Le mélanome de Dubreuilh est également un des mélanomes les moins agressifs.

Le **mélanome acral-lentigineux** ou ALM (pour Acral Lentiginous Melanoma) se développe de façon majoritaire dans les paumes des mains, les plantes des pieds, sous les ongles ou encore sur les muqueuses buccales. Cette forme de mélanome n'est pas liée à l'exposition aux UVs. Il s'agit de la forme de mélanome la plus courante pour les populations asiatiques et africaines avec 35 à 65% des cas mais ne représente que 5% des mélanomes pour les populations caucasiennes.

Le **mélanome des muqueuses** est une forme rare de mélanome qui représente moins de 5 % des cas. Il se développe dans les muqueuses telles que la cavité buccale, le vagin, la vulve, le nasopharynx ou les sinus. Certains spécialistes considèrent que les mélanomes des muqueuses sont des disséminations métastatiques d'un mélanome primaire non identifié.

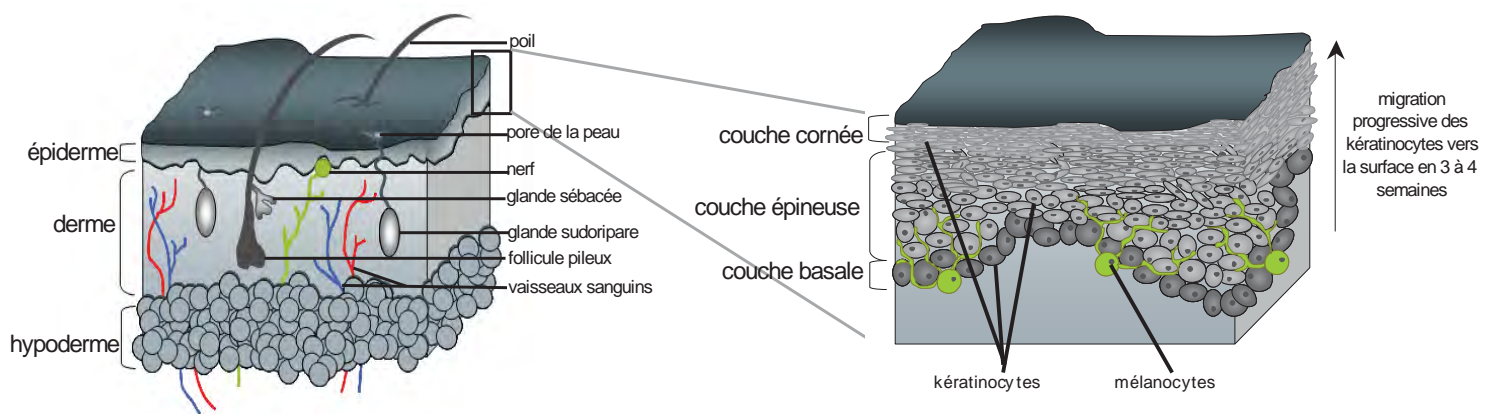


Figure 4 : les mélanocytes de la peau

Les mélanocytes sains sont situés dans la couche basale de l'épiderme. Le schéma de gauche représente une coupe de peau avec les positionnements de l'hypoderme, du derme et de l'épiderme. Le schéma de droite représente l'épiderme composé de la couche cornée, de la couche épineuse et de la couche basale dans laquelle se situent les mélanocytes.

2 LA PHYSIOPATHOLOGIE DU MELANOME

2.1 Le développement normal des mélanocytes

2.1.1 Les mélanocytes sont des cellules différenciées

Les mélanocytes sont des cellules pigmentées présentant un phénotype morphologique assez caractéristique avec des extensions dendritiques. Ils se localisent dans la peau, l'œil et l'oreille interne. Dans la peau, ils se situent à la jonction entre le derme et l'épiderme au niveau de la couche basale (figure 4). Les mélanocytes sont des cellules différenciées et spécialisées dans la production de la mélanine, un pigment qui intervient dans la protection contre les rayonnements ultraviolets. La mélanine s'accumule dans des vésicules appelées mélanosomes qui sont transférées aux kératinocytes par les extensions dendritiques (Park et al. 2009). Les kératinocytes re-distribuent ensuite ces vésicules dans les régions exposées au soleil pour protéger l'ADN des cellules de l'épiderme contre la capacité mutagène des rayonnements ultraviolets (pour revue, Lin et al. 2007).

2.1.2 Les mélanocytes sont issus de la crête neurale

Les mélanocytes ont pour origine une structure transitoire de l'embryon humain appelée crête neurale. Après la fécondation, l'œuf connaît tout d'abord une série de mitoses qui le transforme en morula. Puis à partir de la morula, le blastocyste se développe et commence à se séparer en tissus embryonnaires (feuillet germinaux) et extra-embryonnaires (structures de soutien). Au stade de la gastrulation, les feuillets germinaux se développent et l'embryon devient tridermique comprenant alors un mésoderme, un endoderme et un ectoderme. La crête neurale apparaît lors de la neurulation au sein de l'ectoderme entre la plaque neurale et l'épiderme lorsque les bords de la plaque neurale convergent pour refermer le tube neural. La formation de la crête neurale aux temps précoces est en partie dépendante de la protéine BMP (pour Bone Morphogenetic Protein). La voie Notch est également impliquée dans le développement des cellules de la crête neurale en empêchant que les cellules n'adoptent le profil des cellules souches pendant la neurulation (pour revue, White et al. 2008 ; Grichnik 2008). Les cellules de la crête neurale, situées dans le toit du tube neural, subissent une transition épithélio-mésenchymateuse et acquièrent un fort pouvoir migratoire qui leur permet de coloniser un grand nombre de tissus. L'acquisition du profil migratoire au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse implique une diminution de l'expression de

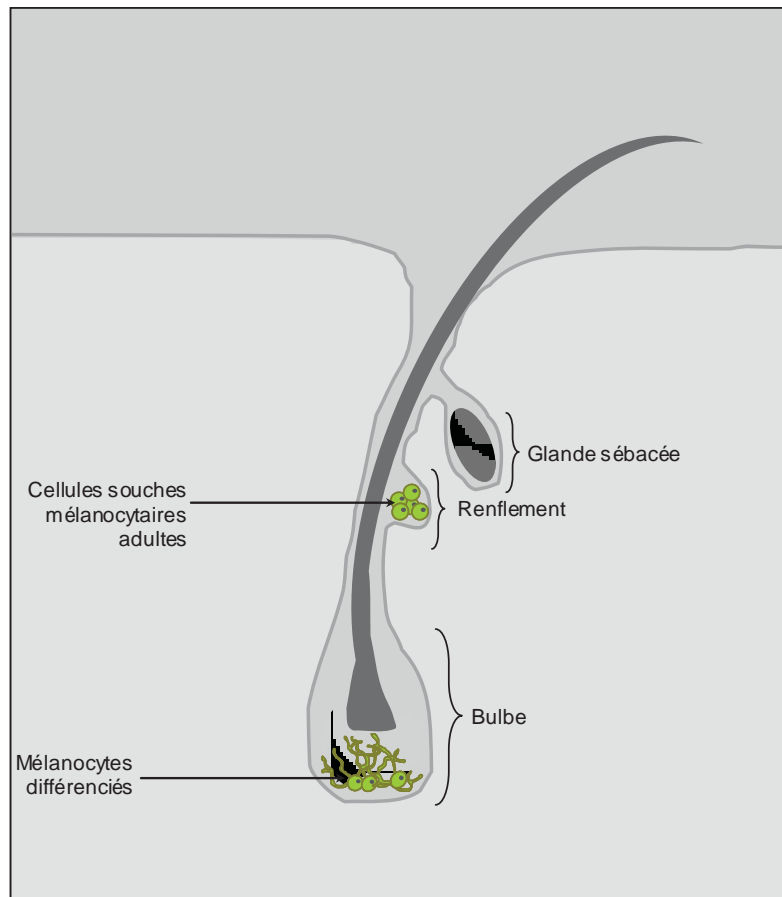


Figure 5 : les mélanocytes et cellules souches adultes de mélanocytes dans le follicule pileux

Des mélanocytes différenciés sont retrouvés à la base du bulbe du follicule pileux permettant la pigmentation des cheveux. Au niveau du renflement du follicule, on retrouve des cellules souches adultes de mélanocytes destinées à fournir les mélanocytes différenciés du follicule pileux et de la peau. Cette figure est adaptée de Sommer 2005.

molécules d'adhésion telles que la E-cadhérine réprimée notamment par les facteurs de transcription de la famille snail/slug (pour revue, Uong et al. 2010).

Les cellules de la crête neurale sont capables de se différencier en neurones et cellules gliales du système nerveux périphérique, en cellules endocrines dans les glandes surrénales et la thyroïde et en mélanocytes. Au niveau du crâne, la crête neurale produit également des cellules mésenchymateuses qui se différencient en cartilages et os du crâne ainsi qu'en cellules du derme, du tissu adipeux et de la paroi vasculaire (Dupin et al. 2003 et pou revues, Dupin et al. 2007 ; Le Douarin et al. 2008 ; White and Zon 2008). Au cours de la migration, les cellules de la crête neurale vont tout d'abord acquérir la capacité à se différencier en progéniteurs pluripotents puis bipotents. Les progéniteurs bipotents cellules gliales-mélanocytes se développent ensuite en mélanoblastes qui migrent au niveau de l'épiderme et dans les follicules pileux. La voie de signalisation de Wnt intervient pour orienter le développement en mélanocyte ou cellules gliales à travers l'action de la β -caténine. Une sur-expression de la β -caténine entraîne en effet une augmentation du nombre de mélanocytes et une diminution des cellules gliales (pour revue, White and Zon 2008).

2.1.3 Les mélanocytes et cellules souches adultes de mélanocytes

Les mélanoblastes situés dans le derme se différencient ensuite en mélanocytes produisant la mélanine soit au niveau de la couche basale de l'épiderme pour la pigmentation de la peau soit au niveau du follicule pileux. Ceux situés dans le follicule pileux sont divisés en deux populations. La première population, située au niveau du bulbe, est destinée à donner des mélanocytes différenciés qui fourniront la pigmentation des cheveux. La deuxième population est située au niveau du renflement des follicules pileux formant la niche des cellules souches adultes de mélanocytes (figure 5) (pour revue, Sommer 2005). Cette niche fournit un micro-environnement spécifique où les cellules souches adultes de mélanocytes restent quiescentes et s'auto-renouvellent dans un état indifférencié. Cependant des stimulations ou des dommages extérieurs peuvent les pousser à proliférer et se différencier. La voie Wnt joue un rôle dans la différenciation terminale en mélanocytes. Les endothélines et notamment l'endothéline 3 associées au récepteur EDNBR (endothelins-B receptor) sont quant à elles essentielles pour la survie et la migration des mélanoblastes (pour revue, White and Zon 2008 ; Uong and Zon 2010). KIT intervient également dans le développement des mélanocytes mais son rôle semble dépendre des espèces puisque, chez la souris, il permet la migration des mélanoblaste et que, chez le poisson zèbre, il intervient dans la survie et la migration des mélanocytes (pour revue, Uong and Zon 2010).

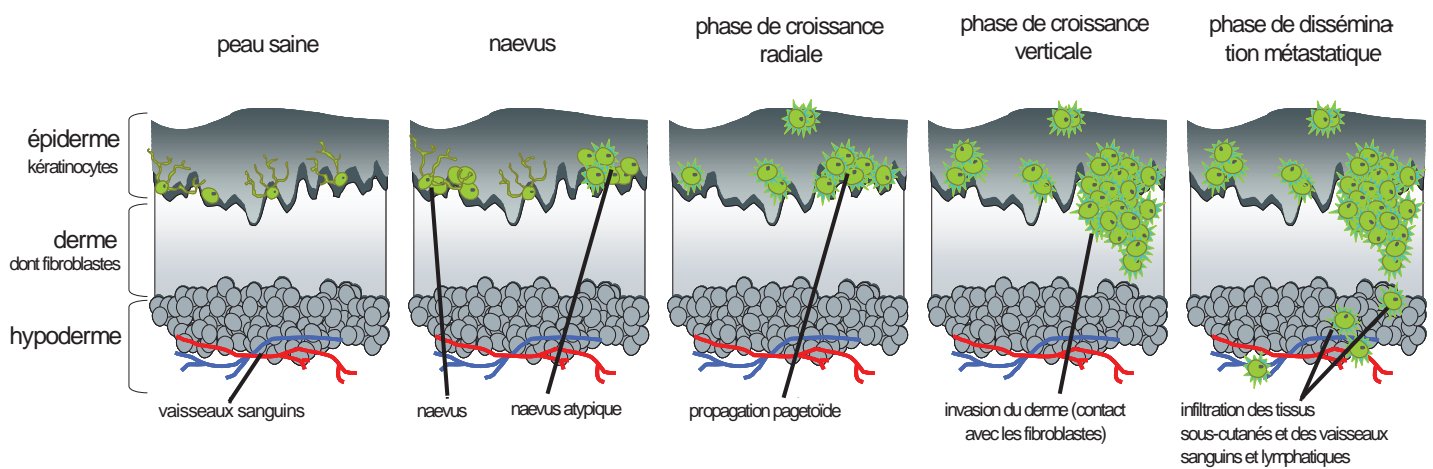


Figure 6 : modèle de développement linéaire du mélanome

Le développement d'un mélanome à partir de mélanocytes sains et la progression de la maladie peuvent se décomposer en plusieurs étapes successives représentées sur le schéma. La première phase correspond au développement d'un naevus, puis s'en suit une phase de croissance radiale et une phase de croissance verticale avec une invasion du derme avant la dissémination métastatique. Ce schéma est adapté de Gray-Schopfer et al. 2007 et Gaggioli et al. 2007.

Chez l'homme adulte, la peau est l'organe qui se régénère le plus avec le système hématopoïétique. Chez les enfants et les jeunes adultes, les cellules souches adultes de mélanocytes, non pigmentées et exprimant MITF (pour microphthalmia-associated transcription factor) sont localisées dans le renflement du follicule pileux. Entre 40 et 60 ans, ces cellules diminuent et laissent place à des cellules pigmentées exprimant MITF. Enfin, passé 70 ans environ, aucune cellule exprimant MITF n'est détectée. Différents marqueurs de cellules souches adultes de mélanocytes ont été identifiés avec notamment MITF, PAX3 et Notch. La voie MITF régule à la fois la survie en permettant l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 et également la différenciation à travers la transcription de gènes liés à la pigmentation tels que *DCT*, *TYROSINASE*, *TRP1* ou *MC1R*. PAX3 et Sox10 induisent l'expression de MITF et donc BCL-2 mais PAX3 empêche également l'expression des gènes de différenciation régulés par MITF et participe donc à maintenir un état indifférencié au sein du renflement du follicule pileux. A l'inverse, la β -caténine à travers la voie Wnt permet de renverser la tendance et inhibe l'effet de PAX3 sur l'expression des gènes de différenciation. Notch joue également un rôle dans le maintien des cellules souches de mélanocytes adultes (pour revue, Sommer 2005 ; White and Zon 2008).

2.2 La physiopathologie cellulaire

2.2.1 Le modèle linéaire classique

Le développement d'un mélanome à partir de mélanocytes sains et la progression de la maladie peuvent se décomposer en plusieurs étapes successives selon le modèle de la progression linéaire (pour revue, Gaggioli et al. 2007) (figure 6) :

- L'apparition d'un nævus bénin est caractéristique d'une prolifération aberrante de mélanocytes et présente un niveau plus ou moins élevé de dysplasie (nævus atypique). La grande majorité ne donne jamais lieu à tumeur maligne.
- Dans quelques cas, il s'en suit une phase de croissance radiale où les cellules acquièrent la capacité à proliférer au niveau de l'épiderme.
- Durant la phase de croissance verticale, les cellules acquièrent un caractère invasif et commencent à envahir le derme et les tissus sous-cutanés.
- Enfin, le mélanome métastase et les cellules disséminent à travers les réseaux sanguins et lymphatiques pour envahir des organes distants. La plupart des métastases sont retrouvées au niveau cérébral, pulmonaire, hépatique, osseux, ainsi qu'au niveau de la peau et des ganglions lymphatiques.

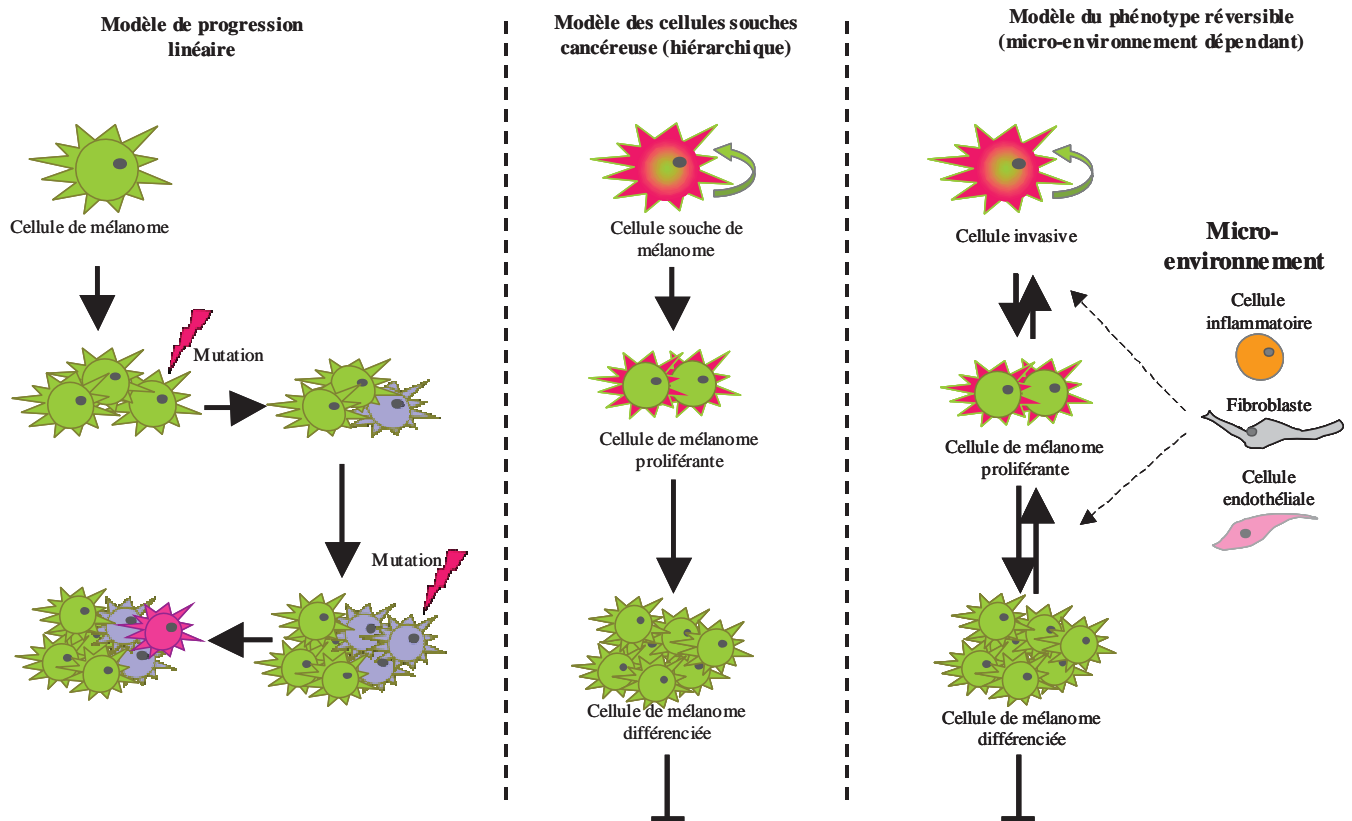


Figure 7 : Les différents modèles de progression du mélanome

Le **modèle de progression linéaire** (à gauche) stipule que l'instabilité génétique et l'expansion clonale sont à l'origine du développement du mélanome et que les propriétés proliférantes ou invasives des cellules cancéreuses sont obtenues par mutations génétiques successives.

Le **modèle des cellules souches cancéreuses** (au centre) prédit que seule une sous-population des cellules de mélanome possède un pouvoir tumorigène. La tumeur devient hétérogène au cours des cycles de prolifération et de différenciation des cellules souches cancéreuses. Les cellules souches cancéreuses peuvent dériver de la transformation de cellules souches adultes de mélanocytes, ou de la dé-différenciation de mélanocytes sains.

Le **modèle du phénotype réversible** (à droite) propose une plasticité des phénotypes cellulaires en fonction des interactions avec le micro-environnement. Les cellules cancéreuses pourraient ainsi acquérir un caractère invasif, prolifératif ou différencié suivant leur environnement.

Selon ce modèle de progression tumorale linéaire classiquement admis, toutes les cellules sont potentiellement tumorigènes et c'est l'instabilité génétique qui conditionne l'évolution de la maladie. Ce modèle se base en effet sur l'expansion clonale d'une population ayant acquis des propriétés particulières en terme de prolifération suite à des mutations génétiques (figure 7). Cette population d'abord homogène se diversifie ultérieurement toujours suite à des événements d'ordre génétique pour donner naissance à des sous-populations plus invasives.

2.2.2 Le modèle des cellules souches cancéreuses

Seuls 36% des mélanomes se développent sur un nævus pré-existant indiquant que la majorité des mélanomes surviennent à partir d'une peau saine et ne suivent pas ce modèle de progression linéaire. D'autres modèles de progression du mélanome ont ainsi été développés (pour revues, Rambow et al. 2010 ; Houben et al. 2008 ; La Porta 2009 ; Smalley et al. 2009).

Selon le **modèle des cellules souches cancéreuses**, seule une faible proportion des cellules est responsable de la tumorigénèse. Ce modèle propose qu'une sous-population possédant certaines caractéristiques des cellules souches somatiques est capable de proliférer et de donner des cellules filles différenciées formant la masse tumorale permettant de maintenir la croissance tumorale. On peut envisager différentes provenances pour cette sous-population. Elle peut être la conséquence de la transformation tumorale d'une cellule non différenciée (une cellule souche somatique ou encore d'une cellule progénitrice). Elle peut également dériver d'une cellule déjà différenciée ayant acquis des caractéristiques souches par le processus de transformation tumorale en réactivant des voies de signalisation spécifiques (figure 7). En l'absence de consensus sur les caractéristiques attribuées aux cellules souches cancéreuses, une commission de l'AACR (American Association for Cancer Research) a proposé une définition unifiée de ce concept selon laquelle une cellule souche cancéreuse est une cellule possédant des capacités d'auto-renouvellement et étant à l'origine de l'hétérogénéité de la masse tumorale (pour revue Girouard et al. 2011).

Un dernier modèle, appelé **modèle de l'interconversion**, propose que l'hétérogénéité tumorale résulte de l'expression ou de la ré-expression de certains gènes en réponse à des stimuli du micro-environnement. Ainsi, les cellules tumorales seraient capables, en réponse au micro-environnement, de passer d'un état de cellules prolifératives à un état de cellules

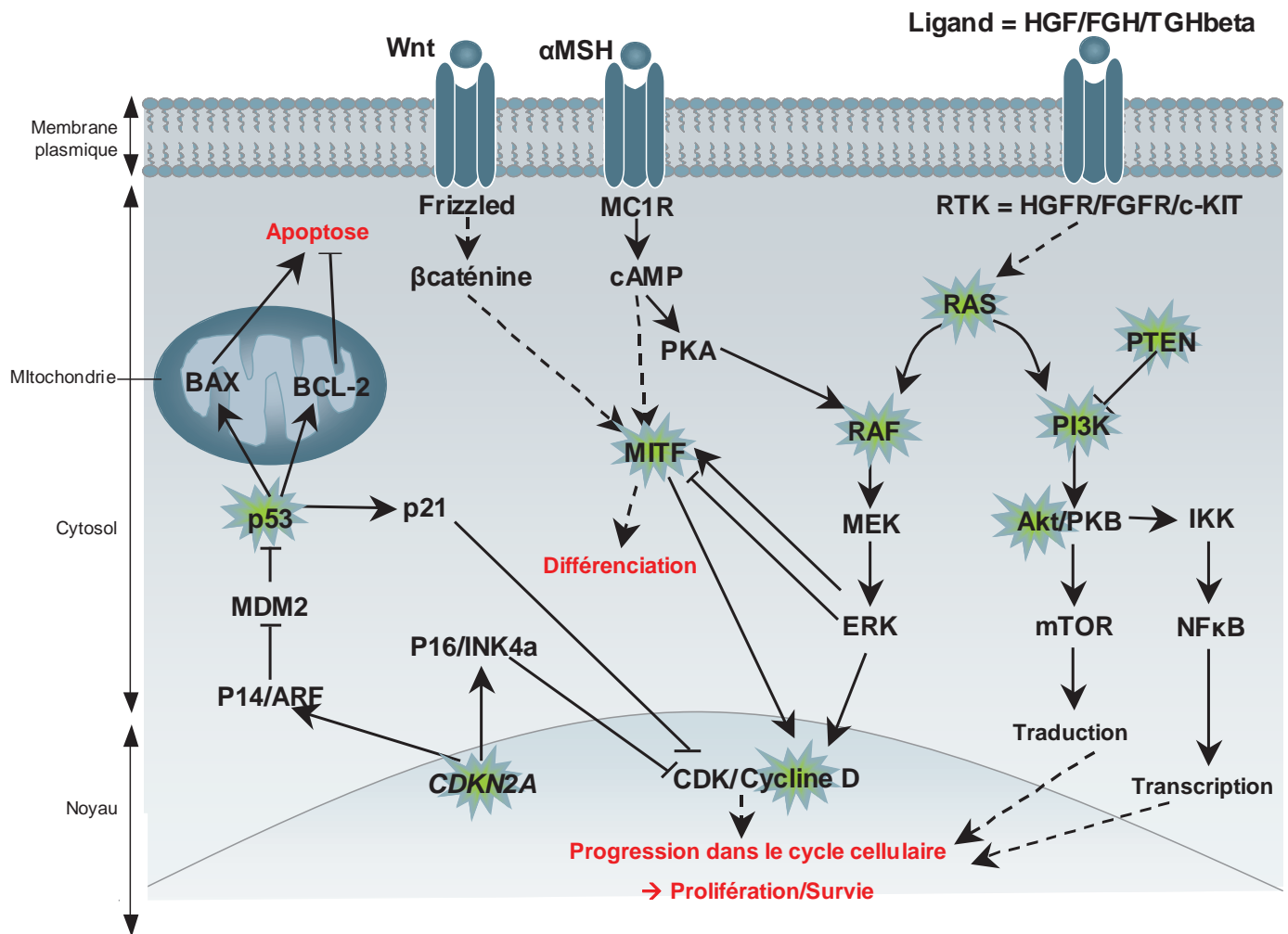


Figure 8 : Les voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome

Plusieurs voies de signalisation sont altérées au cours du développement d'un mélanome. Ces voies de signalisation sont représentées dans le schéma et les protéines étoilées correspondent aux plus fréquemment mutées et/ou dérégulées. Ce schéma est adapté de Palmieri et al. 2009.

Type de gène	Gène	Type d'altération et fréquence dans les mélanomes (%)
Proto-oncogènes	BRAF	muté dans 50-70% des cas
	NRAS	muté dans 15-30% des cas
	AKT3	Sur-exprimé
Suppresseurs de tumeurs	CDKN2A	supprimé, perdu ou sous-exprimé dans 30-70% des cas
	PTEN	supprimé ou perdu dans 5-20% des cas
	APAF-1	sous-exprimé dans 40% des cas
	P53	perdu ou muté dans 10% des cas
Autres	Cyclin D1	amplifié dans 6-44% des cas
	MITF	amplifié dans 15-20% des cas

Tableau 1 : Fréquence des mutations au cours du développement du mélanome

Plusieurs gènes, oncogènes, supresseurs de tumeurs ou autres sont dérégulés dans le mélanome. La fréquence et le type d'altérations rencontrées pour chacun d'entre eux sont indiqués dans le tableau. Ce tableau est adapté de Gray-Schopfer et al. 2007.

invasives ou encore différenciées (Hoek et al. 2008 ; Eichhoff et al. 2010 et pour revue, Hoek et al. 2009 ; Hoek et al. 2010) (figure 7). Le changement entre les états prolifératifs et invasifs a récemment été associé à la voie de signalisation Wnt. La distribution de la β -caténine apparaît phénotype spécifique avec une présence membranaire associée à un état prolifératif et une présence cytosolique à un état invasif. De même les co-facteurs LEF1 (pour Lymphoide Enhancer Factor 1) et TCF4 (Transcription Factor 4) de la β -caténine sont exprimés différemment suivant les phénotypes (expression préférentielle de LEF1 dans les cellules prolifératives plus différenciées et de TCF4 dans les cellules invasive moins différenciées) (Eichhoff et al. 2011).

2.3 La physiopathologie moléculaire

2.3.1 Le passage d'un nævus à un mélanome primaire

Le passage d'un nævus bénin à un nævus dysplasique est caractérisé par une expansion clonale, une réduction de l'apoptose et une diminution de la sénescence des mélanocytes (pour revue, Slominski et al. 2001). Cette phase est caractérisée par des altérations génétiques ou épi-génétiques affectant la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose (pour revue, Gray-Schopfer et al. 2007 ; Kuphal et al. 2009 ; Palmieri et al. 2009). Les gènes mutés sont pour la plupart des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs et sont impliqués dans plusieurs voies de signalisation (figure 8 ; tableau 1).

La voie des MAPK impliquant la cascade d'activation RAS/RAF/MEK/ERK contrôle la prolifération et la survie cellulaire. Cette voie de signalisation joue un rôle particulièrement important dans le cas du mélanome avec une hyperactivation retrouvée dans 80% des cas. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à cette activation tels que la production par voie autocrine de facteurs de croissance, la modification des récepteurs à tyrosine kinase ou des mutations activatrices dans les effecteurs de la voie comme RAS ou RAF. Le gène *c-KIT* est sur-activé dans certains cas de mélanome par mutation ou augmentation du nombre de copies du gène. Des mutations activatrices de NRAS ont également été identifiées dans 15 à 30% des mélanomes (pour revue, Gray-Schopfer et al. 2007). De plus les souris transgéniques présentant la mutation de la glutamine en position 61 en lysine (Q61K) de la protéine NRAS et déficientes pour INK4a développent spontanément des mélanomes (Ackermann et al. 2005 et pour revue Ghosh et al. 2009). La mutation la plus fréquente dans le mélanome concerne la

kinase BRAF et représente 50 à 70% des cas de mélanomes. Les mutations de BRAF sont mutuellement exclusives avec celles de NRAS. Parmi ces mutations, le remplacement de la valine en position 600 par un acide glutamique (V600E) est particulièrement important puisqu'il est présent dans 50% des mélanomes. Cette mutation de BRAF entraîne une activation anormale de la signalisation des MAPK en aval de la kinase BRAF conduisant à une activation de la prolifération et une augmentation de la capacité de survie des cellules tumorales. Il existe également d'autres mutations plus rares de la valine 600 remplacée dans certains cas par une lysine (V600K) ou une arginine (V600R) (pour revue, Scolyer et al. 2011 ; Arkenau et al. 2011). La présence de BRAF muté est également détectée dans les nævi bénins et dysplasiques montrant qu'il s'agit d'un événement précoce dans la progression du mélanome. De plus, les souris transgéniques mutées BRAF^{V600E} forment spontanément des mélanomes (Dhomen et al. 2009).

La voie PI3K/AKT est également fréquemment dérégulée dans le mélanome (pour revue, Gray-Schopfer et al. 2007 ; Kuphal and Bosserhoff 2009). La mutation PI3K α pourtant fréquemment retrouvée dans les pathologies cancéreuses n'est présente que dans 3% des mélanomes métastatiques. La perte de PTEN par mutation ou mécanisme épigénétique est observée dans 5 à 30 % des mélanomes en stades terminaux. Les souris transgéniques *Pten*^{-/-} meurent dans les stades précoces de l'embryogenèse, et les souris hétérozygotes *Pten*^{+/-} développent de nombreuses pathologies tumorales mais seules les souris *Pten*^{+/-}/*Cdkn2a*^{+/-} développent des mélanomes (pour revue, Chin 2003 ; Ghosh and Chin 2009). La surexpression d'AKT est notée dans 60 % des mélanomes. L'ensemble de ces dérégulations participent à l'activation globale de la voie PI3K/AKT régulant ainsi la prolifération cellulaire et l'apoptose mais aussi le réarrangement du cytosquelette.

La voie p53 est très fréquemment dérégulée dans les cancers mais dans le cas du mélanome, la perte de p53 est observée dans seulement 10% des cas. La protéine p16^{INK4a} freine la prolifération cellulaire et si les inactivations mutationnelles sont quasiment exclusivement retrouvées dans les mélanomes familiaux, une extinction de l'expression de p16^{INK4a} par méthylation de l'ADN est retrouvée dans 75% des cas (Marini et al. 2006). L'inactivation de cette voie perturbe également le contrôle de l'apoptose et du cycle cellulaire.

La voie Wnt/ β -caténine a également été impliquée dans le développement du mélanome par une activation constitutive comme en atteste l'accumulation de la β -caténine dans le noyau (Larue et al. 2009a). Le rôle de la β -caténine dans le mélanome est encore

Type de lésion	Mutation BRAF	Mutation NRAS	Mutation c-KIT
Mélanome cutané non liés à l'exposition chronique au soleil	59%	22%	0%
Mélanome cutané liés à l'exposition chronique au soleil	11%	15%	2%
Mélanome des muqueuses	11%	5%	20%
Mélanome acral	23%	10%	15%

Tableau 2 : La fréquence des différentes mutations dépend du type de mélanome

Les mutations observées au cours du développement moléculaire de la pathologie du mélanome dépendent fortement du type de mélanome considéré. Les mutations des voies BRAF/NRAS sont plus fréquentes sur les mélanomes cutanés et les mutations c-KIT se retrouvent dans les mélanomes acraux et des muqueuses. (Curtin et al. 2005)

controversé. En effet, il est établi qu'une augmentation de son expression nucléaire et cytoplasmique est un facteur de bon pronostic. Cependant, il a également été montré à l'aide de souris transgéniques $NRAS^{Q61K}/bcat^{sta}$ que sa stabilisation induit une inhibition de $p16^{INK4a}$ conduisant à une immortalisation des mélanocytes sans pour autant augmenter la prolifération comme cela a été montré dans d'autres types cancéreux. Cela suggère que la β -caténine pourrait contribuer à des événements précoces du développement des mélanomes (Delmas et al. 2007 ; Larue et al. 2009b). Le facteur de transcription MITF (pour Microphthalmia-Associated Transcription Factor) apparaît comme un élément important de la prolifération et la survie des mélanocytes avant et pendant leur migration à partir de la crête neurale. Il est retrouvé amplifié dans 15 à 20 % des mélanomes et a été inversement corrélé à la survie des patients. Cependant, le rôle exact de ce facteur de transcription dans le mélanome n'a pas encore été élucidé et l'état actuel des connaissances permet d'envisager un rôle conditionné par son niveau d'expression. Une forte expression de MITF serait ainsi corrélée à un état prolifératif tandis qu'une faible expression de MITF serait associée à un état invasif et peu prolifératif (Arozarena et al. 2011, et pour revue Palmieri et al. 2009).

Suivant l'origine du développement du mélanome, les types de mutations varient considérablement. En effet, des tumeurs n'ayant pas pour cause l'exposition chronique au soleil, présentent une plus grande proportion de mutations BRAF que de mutations NRAS, avec une quasi-absence de mutations de c-KIT. Au contraire, des lésions dérivant de peaux subissant des épisodes chroniques d'expositions aux rayonnements ultraviolets présentent légèrement plus de mutations NRAS que BRAF et le taux global de mutations de cette voie de signalisation est plus faible. Enfin, les mélanomes issus des muqueuses ou de zones non exposées au soleil présentent significativement plus de mutations c-KIT (tableau 2) (Curtin et al. 2005).

2.3.2 Invasion du derme et des vaisseaux sanguins et lymphatiques

Les cadhérines sont des protéines favorisant les communications intercellulaires et sont particulièrement liées à la progression tumorale métastatique. La transition entre la phase de croissance radiale et la phase de croissance verticale est caractérisée par un échappement au contrôle des kératinocytes et une capacité à envahir les couches fibroblastiques du derme (pour revue, Gaggioli and Sahai 2007). Ce phénomène se caractérise par une perte d'expression de la E-cadhérine et une augmentation de l'expression de la N-cadhérine typique d'une transition épithélio-mésenchymateuse notamment médiée par la voie BRAF (pour revue, Lin et al. 2010). En diminuant l'expression de la E-cadhérine, les cellules

de mélanome parviennent à réduire leurs interactions avec les kératinocytes qui contrôlent la prolifération et le comportement normal des mélanocytes sains (Hsu et al. 2000). A l'inverse, l'augmentation du niveau d'expression de la N-cadhérine et de protéines associées permet aux cellules de mélanome d'interagir avec les fibroblastes du stroma dans le derme ainsi qu'avec les cellules endothéliales constituant la paroi des vaisseaux (Smalley et al. 2005 ; Haass et al. 2005).

Les intégrines permettent de transmettre à la cellule une information relative à la nature et la composition du milieu et engendre une réponse cellulaire adaptée. Les hétérodimères de type $\alpha 5\beta 3$ qui interagissent avec de nombreux composés de la matrice extracellulaire sont sur-exprimés dans les mélanomes agressifs et corrélerent avec la phase de croissance verticale. De plus, ces protéines interagissent avec MMP2 (pour Matrix MetalloProtein 2) impliquée dans dégradation de la matrice extracellulaire (Pinon et al. 2011).

La molécule d'adhésion MCAM/MUC18 (aussi appelée CD146) est également sur-exprimée lorsque les mélanomes deviennent plus invasifs et son expression corréle avec un mauvais pronostic clinique. Sa sur-expression induit une activation de MMP2 (Xie et al. 1997) et facilite les interactions avec les cellules endothéliales (pour revue, Bogenrieder et al. 2002) et participe donc à favoriser l'interaction avec le système vasculaire.

L'expression de nombreux **facteurs de croissance** est également altérée durant la phase invasive du mélanome avec notamment une augmentation de l'expression de HGF (pour Hepatocyte Growth Factor), de FGF (pour Fibroblast Growth Factor) ou de TGFbeta (Transforming Growth Factor β). En supplément de cette fonction autocrine, les cellules de mélanomes ont également une stratégie paracrine avec la production de FGF et de TGFbeta qui entraîne chez les fibroblastes une sécrétion de signaux pro-invasifs tels que la tenascine-C ou HGF (pour revue, Gaggioli and Sahai 2007).

3 LES MODELES D'ETUDE *IN VITRO* ET *IN VIVO* DU MELANOME

3.1 La culture de lignées cellulaires de mélanome

3.1.1 La culture en mono couche adhérente

Tout d'abord, la communauté scientifique a, au cours du temps, développé un grand nombre de lignées cellulaires stables qui ont été établies à partir de prélèvements de mélanomes primaires (WM-115 par exemple) ou métastatiques (WM-266-4, G-361, SK-MEL-28, A-375 par exemple). On compte en effet aujourd'hui plus de 5 000 lignées de mélanomes établies et plus de 200 caractérisées, plus que pour la plupart des autres types de cancer (pour revue, Herlyn et al. 2010). Certaines de ces lignées cellulaires sont des modèles faciles à obtenir. Cependant, il n'est pas à exclure que, durant l'établissement de ces lignées, un grand nombre de paramètres aient dérivé conduisant ainsi à un modèle d'étude faussé. En effet les cellules en culture sont dissociées de leur micro-environnement et développent vis-à-vis de ce nouvel environnement des caractéristiques propres.

3.1.2 Les modèle de culture en trois dimensions de cellules de mélanome

Les lignées cellulaires établies ainsi que les échantillons de patients peuvent également être mis dans des conditions de culture spécifiques permettant une croissance en trois dimensions plutôt qu'une culture en monocouche.

Le premier modèle de culture en trois dimensions est le modèle des sphéroïdes obtenus par inhibition mécanique de l'adhésion des cellules grâce à une méthode de culture sur agar mou ou de culture en goutte. Les cellules proliférantes sont retrouvées à la périphérie de la structure et les cellules nécrotiques au centre du sphéroïde. Le deuxième modèle de culture en trois dimensions est le modèle des mélanosphères par analogie avec des structures équivalentes développées pour différents types cancéreux (mammosphères pour les cancers du sein, neurosphères pour les cancers du cerveau). Les mélanosphères sont obtenues grâce à des milieux développés pour la culture de cellules souches. Il s'agit de structures plus petites que les sphéroïdes.

Ces modèles de culture en sphéroïdes ou mélanosphères tentent de recréer une structure et un environnement 3D plus proches d'une tumeur *in vivo* en reproduisant notamment les zones de nécrose, l'accessibilité à l'oxygène, aux nutriments ou aux molécules

chimiothérapeutiques. La culture de sphéroïdes peut être améliorée par implantation sur une couche de collagène, élément principal de la matrice extracellulaire de la peau humaine. Certaines de ses structures ont été associées avec un potentiel de migration plus important que la culture en monocouche ainsi qu'avec des fonctions immuno-modulatrices (Ghajar et al. 2007 ; Santiago-Walker et al. 2009 ; Ramgolam et al. 2011).

3.1.3 Les co-cultures et les modèles de peau reconstruites

Les co-cultures permettent de reproduire un micro-environnement défini en rétablissant des interactions avec d'autres types cellulaires. Des modèles plus élaborés proposent des systèmes 3D de kératinocytes capables de mimer la membrane basale et favorisant la prolifération des cellules de mélanome cultivées dans cet environnement. Des structures atteignant 1 cm de diamètre sont ainsi générées et permettent de donner une bonne alternative *in vitro* aux lignées adhérentes (Marrero et al. 2009).

Les modèles de peau reconstruites permettent de mimer les trois couches d'une peau naturelle avec un derme artificiel composé d'une matrice de collagène et de fibroblastes, un épiderme composé de kératinocytes et d'une membrane basale où se localisent les mélanocytes fonctionnels formant des dendrites et procurant de la mélanine aux kératinocytes. Les cellules de mélanome introduites dans ce type de modèles permettent de reproduire les conditions *in vivo* avec des phases de croissance radiale et verticale ainsi qu'une invasion du derme. De plus ces modèles peuvent être utilisés avec des cellules génétiquement modifiées et ou transfectées, permettant ainsi l'étude des fonctions protéiques ou la réponse à un micro-environnement particulier. Il a ainsi été montré que la sur-expression de l'intégrine $\beta 3$ entraînait un passage des mélanomes de la phase de croissance radiale à la phase de croissance verticale (pour revue, Santiago-Walker et al. 2009).

3.2 Les modèles de xénogreffes chez la souris

3.2.1 Les différents modèles de souris

Les lignées ou prélèvements de patients peuvent être greffés chez l'animal (xénogreffe) et en particulier chez la souris immunodéprimée dans un environnement *in vivo* qui reste néanmoins différent de celui d'une tumeur chez un patient. Il existe différents modèles de souris immunodéprimées utilisables pour ce type d'expériences parmi lesquels, les souris Swiss nude, les souris NOC/SCID et les souris NSG ou NOG. La souche de souris nude (ainsi

dénommée à cause de son absence de poils) présente des mutations génétiques entraînant une aplasie thymique et donc une réduction voir une absence de lymphocytes T. Les souris NOD/SCID (pour Non-Obese Diabetic Severe Combined ImmunoDeficiency) sont des animaux présentant une mutation du gène *Prkdc* impliqué dans le développement des lymphocytes T et B dans un contexte NOD entraînant un défaut dans la fonction des macrophages et une activité réduite des cellules NK (pour Natural Killer). Ces animaux sont donc plus immunodéprimés que les souris nude puisqu'ils ne possèdent ni lymphocyte T ni lymphocyte B. Les souris NSG (ou NOD SCID gamma pour NOD SCID *IL2ry^{tm1Wjl}*) correspondent à des souris NOD SCID ayant subi une mutation invalidante du gène codant pour le récepteur à l'interleukine 2 impliqué dans la différenciation des cellules NK. Les souris NOG (pour NOD SCID *IL2ry^{null}*) ont un statut immunitaire comparable à celui des souris NSG puisqu'elles présentent elles aussi un gène *IL2ry* non fonctionnel (pour revue, Carson et al. 2002).

Cependant, dans ce modèle, les échanges entre micro-environnement et tumeur ne sont pas superposables à la biologie des patients du fait de l'incompatibilité entre les espèces humaine et murine. De plus le système immunitaire est défectueux dans ce modèle.

3.2.2 Les modèles syngéniques

Des systèmes syngéniques ont également été développés. Même si les souris ne développent pas spontanément de mélanome, de rares cas de mélanomes murins spontanés ont été utilisés avec notamment les lignées Harding-Passey, S91 (Cloudman) et la lignée B16 avec ses dérivés agressifs B16F1 et B16F10 issues de souris ICR, DBA et C57BL/6 respectivement. Le modèle B16 permet une prise tumorale très rapide et induit des métastases pulmonaires dans le cas des cellules B16F10. Cependant, ces modèles ne reflètent pas parfaitement la pathologie humaine (pour revue, Carson and Walker 2002). En effet, il faut savoir que les mélanocytes murins et humains ne présentent pas la même localisation (les mélanocytes murins étant exclusivement présents dans le bulbe du follicule pileux avec une absence totale de mélanocytes épidermiques).

Modèle de souris transgénique	Modification génétique	Incidence spontanée de mélanome	Métastases spontanées	Référence
INK4a ^{-/-} Arf ^{-/-} :Tyr-HRAS(G12V)	Mutation G12V de NRAS et délétion de p16 ^{INK4a} et p19 ^{ARF}	60%	Aucune	Chin et al., 1997
Tg(HGF/SF)	Souris exprimant HGF et SF au niveau de la peau	50%	Rare	Nooman et al., 2001
Tyr::NRAS ^{Q61K} INK4a ^{-/-}	Mutation Q61K de NRAS et délétion de p16 ^{INK4a}	90%	Ganglions lymphatiques et poumons et foie	Ackermann et al., 2005
BRAF ^{V600E} /CreERT2	Mutation V600E de BRAF	60%	Aucune	Dhomen et al., 2009
Tyr::CreER;BRAF ^{CA} ;PTEN ^{lox/lox}	BRAF wt avant et mutation V600E de BRAF après recombinaison Cre-dépendante	100%	Ganglions lymphatiques et poumons	Dankort et al., 2009

Tableau 3 : Les modèles de souris transgéniques

Différents modèles de souris transgéniques développant spontanément des mélanomes sont maintenant disponibles. Les gènes ciblés ainsi que l'incidence de mélanome observé et la localisation des métastases quand elles existent sont donnés. Ce tableau est tiré de Larue et al. 2007 et Refaeli et al. 2009.

3.3 Les animaux transgéniques

3.3.1 Les souris transgéniques

Comme nous l'avons vu, les souris développent rarement des mélanomes spontanés mais des modèles transgéniques existent et permettent d'étudier l'implication de certains gènes dans le développement du mélanome (tableau 3) (pour revues, Larue et al. 2007 ; Refaeli et al. 2009). Ainsi, des souris délétées ou mutées pour des gènes identifiés dans les cas de mélanome familiaux ont été réalisées et comme vu précédemment les souris *Cdk4^{R24C}* ont tendance à développer plus facilement des mélanomes après exposition à des agents carcinogènes et les souris présentant une délétion du locus *Cdkn2a* (invalidante pour l'expression des protéines Ink4a et Arf) associée à une mutation de HRAS développent des mélanomes de façon spontanée. Les gènes impliqués dans le développement de la pathologie ont également été très étudiés. Ainsi, des souris transgéniques mutées pour NRAS (Tyr::NRAS^{Q61K} INK4a^{-/-}), BRAF (BRAF^{V600E}/CreERT2) ou encore PTEN (Tyr::CreER;BRAF^{CA};PTEN^{lox/lox}) sont aujourd'hui disponibles et permettent d'étudier l'incidence des mélanomes ainsi que la fréquence et le mode d'apparition des métastases.

3.3.2 Les poissons zèbres transgéniques

Des modèles de xénogreffe de cellules humaines de mélanomes sont également utilisés chez le poisson zèbre (Haldi et al. 2006). Le poisson zèbre possède des mélanocytes appelés mélanophores visibles à la surface de l'animal. Cependant, si les pigments mélaniques sont exportés vers les kératinocytes chez l'homme, ceux du poisson zèbre restent confinés dans les mélanophores. Le poisson zèbre développe rarement des tumeurs spontanées mais une exposition à des carcinogènes entraîne la formation de tumeurs dans la plupart de tissus. Des poissons zèbres transgéniques sont également disponibles. Ainsi le poisson zèbre exprimant BRAF^{V600E} présente des lésions pigmentaires de type nævus et le poisson zèbre portant la même mutation dans un contexte p53 muté développe quant à lui des mélanomes. Des mutations NRAS ont également été introduites et engendrent tout comme pour BRAF des problèmes de pigmentation accompagnés de formation de mélanome dans un fond p53 muté (pour revues Ceol et al. 2008 ; Patton et al. 2010).

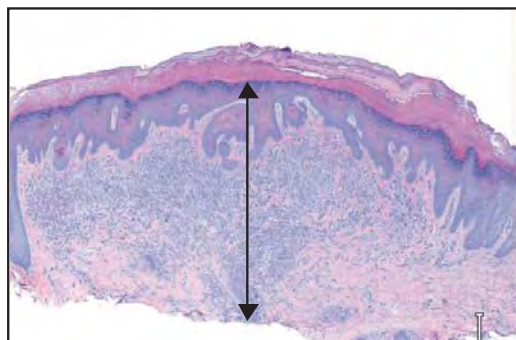


Figure 9 : Mesure de l'indice de Breslow

L'indice de Breslow se mesure entre la couche granuleuse de l'épiderme et la cellule tumorale la plus profonde après fixation et coloration hémalun-éosine.

Epaisseur du mélanome (mm)	Survie estimée à 5 ans (%)
<0,76	100%
0,76-1,50	73,7%
1,51-2,25	78,6%
2,26-3,0	44,4%
>3,0	22,2%

Tableau 4 : Estimation de la survie en fonction de l'indice de Breslow

L'indice de Breslow est un indice histologique permettant une prédiction de la survie à 5 ans d'après une biopsie en fonction de l'épaisseur tumorale maximale entre la couche granuleuse de l'épiderme et la cellule tumorale la plus profonde. Les valeurs de la survie à 5 ans en fonction de l'épaisseur mesurée du Breslow sont indiquées dans ce tableau.

4 LES TRAITEMENTS ACTUELS/DISPONIBLES DU MELANOME METASTATIQUE

90% des mélanomes diagnostiqués sont des tumeurs primaires sans signe évident de la présence de métastases (stade I) et sont systématiquement traités par exérèse chirurgicale. La survie des patients atteints de ce type de tumeur est de 75 à 85% (pour revue Garbe et al. 2010). Le problème du traitement se pose lorsque les patients présentent des signes de dissémination métastatique puisque dans ce cas la survie n'excède pas les 10%. Les traitements proposés sont principalement des immunothérapies pour les stades II et III et des chimiothérapies pour les stades IV mais ces dernières ne permettent pas d'améliorer la survie des patients de façon satisfaisante avec moins de 20% de réponses objectives pour l'ensemble des traitements disponibles (pour revue Bhatia et al. 2009).

4.1 Le pronostic d'un mélanome dépend de la dissémination métastatique

Il existe différents indices pronostiques. Les critères les plus utilisés par les praticiens pour déterminer le stade de la maladie sont les critères TNM. Le premier critère, le critère T tient compte des caractéristiques de la tumeur primaire (épaisseur et ulcération). Le deuxième critère, le critère N est fonction de l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases "en transit". Le troisième critère, le critère M concerne la présence ou non de métastases à distance.

La caractérisation de la tumeur primaire permettant d'établir le paramètre T qui tient compte de différents critères dont l'épaisseur de la tumeur mesurée par l'indice de Breslow (figure 9 ; tableau 4), l'ulcération, l'index mitotique et dans le cas où celui-ci ne peut pas être déterminé, l'indice de Clark.

La présence de métastases au niveau local par rapport à la tumeur primaire ou au niveau des ganglions lymphatiques permet d'établir le critère N. Il s'agit du premier niveau

Classification T			Classification N			Classification M		
	Epaisseur de la tumeur	Paramètres additionnels		Nombre de ganglions lymphatiques impliqués	Etendue des métastases dans les ganglions lymphatiques		Type de métastases à distance	LDH
Tis	NA	In situ, no invasion	N0	0	NA	M0	Pas de métastases à distance	NA
T1	<1,0mm	(a) sans ulcération et mitoses <1/mm ² (b) ulcération ou mitoses >1/mm ²	N1	1	(a) micrométastases (b) macrométastases	M1a	Peau, tissus sous-cutanés, ganglions lymphatiques	Normal
T2	1,01-2,0mm	(a) sans ulcération (b) ulcération	N2	2-3	(a) micrométastases (b) macrométastases (c) métastases satellites ou en transit	M1b	Poumons	Normal
T3	2,01-4,0mm	(a) sans ulcération (b) ulcération	N3	>4 ou métastases en transit et ganglions lymphat		M1c	Toute autre métastase distante	Normal
T4	>4,0mm	(a) sans ulcération (b) ulcération					Toute métastase à distance	élevé

Tableau 5 : La classification TNM appliquée au mélanome

La classification TNM permet aux spécialistes de la santé d'établir un pronostique. Elle se décompose en trois critères. Le critère T tient compte des caractéristiques de la tumeur primaire, le critère N de la dissémination locale et le critère M de la dissémination à distance. Ce tableau est adapté de Garbe et al. 2010 et Balch et al. 2009.

Stade	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC	IV
TNM	T1a	T1b T2a	T2b T3a	T3b T4a	T4b	N1a T1-4a N2a T1-4a	N1a T1-4b N2a T1-4b N1b T1-4a N2b T1-4a N2c T1-4a	N1b T1-4b N2b T1-4b N2c T1-4b N3 tous les T	M1a tous N tous T M1b tous N tous T M1c tous N tous T

Tableau 6: Définition des stades d'avancement de la maladie en fonction de la classification TNM

La définition des stades de développement du mélanome dépend de la classification TNM. Ils sont dans ce tableau associé aux différentes valeurs pronostiques associées à la classification TNM telles que l'épaisseur de la tumeur primaire, le nombre de ganglions lymphatiques atteint par la maladie, le type de métastases retrouvées dans les ganglions lymphatiques et le type de métastases à distance. Ce tableau est adapté de Balch et al. 2001.

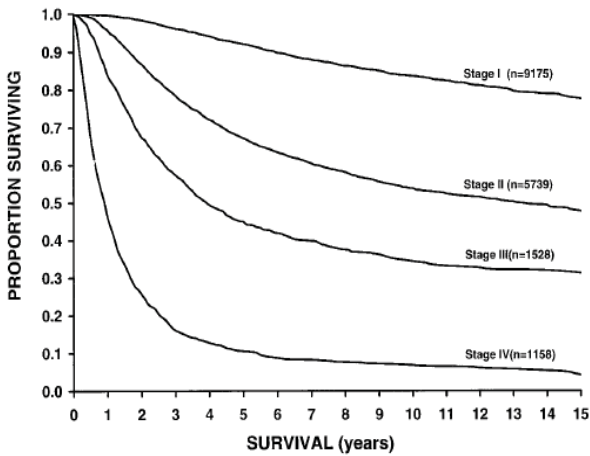


Figure 10 : Courbe de survie en fonction des stades de développement du mélanome

La survie est hautement dépendante du stade d'avancement de la maladie au diagnostic. Le graphique représente l'estimation de la survie en fonction des stades. Ce graphique est tiré de Balch et al. 2001.

métastatique avant les métastases à distance. Les métastases locales peuvent apparaître sous plusieurs formes (pour revue Garbe et al. 2010) :

- les micrométastases identifiées au niveau du ganglion lymphatique par la biopsie du ganglion lymphatique sentinelle. Au contraire des macrométastases, les micrométastases ne peuvent pas être identifiées par palpation ou par des techniques d'imageries.
- les métastases satellites situées au maximum à 2cm de la tumeur primaire.
- les métastases en transit situées entre 2cm de la tumeur primaire et les premiers ganglions lymphatiques
- les métastases au niveau du ganglion lymphatique

La présence de métastases à distance utilisée pour le critère M, rend compte d'un diagnostic beaucoup plus réservé puisque la médiane de survie est seulement de 6 à 9 mois. On différencie les métastases de type cutané et lymphatique, les métastases pulmonaires et les autres métastases à distance telles que les métastases osseuses ou viscérales.

L'analyse de ces différents critères permet d'établir une classification TNM de la maladie. Cette classification est présentée dans le tableau 5 (pour revue Garbe et al. 2010 ; Balch et al. 2009).

L'analyse TNM permet ensuite de définir le stade de la maladie qui est décrit dans le tableau 6. Les stades IA et IB sont associés à un très bon pronostic avec respectivement 95% et 90% de survie à 5 ans. Les stades IIA et IIB sont eux aussi de relativement bons pronostiques avec une survie moyenne à 5 ans de respectivement 78% et 65%. Les stades IIC, IIIA et IIIB présentent des espérances de vie qui décroissent rapidement avec respectivement 45%, 65% et 50% de patients encore en vie après 5 ans. Le stade IIIC quant à lui montre une survie à 5 ans de l'ordre de 25% seulement et pour le stade IV le type de métastases à distance fait varier la survie à 5 ans entre 19% pour les métastases osseuses et 7 à 9% pour des métastases viscérales (figure 10).

4.2 Les traitements par chirurgie

La chirurgie de la tumeur primaire s'effectue en deux fois avec une première intervention visant à retirer la lésion afin qu'elle soit analysée par le laboratoire d'anatomopathologie. Suite à cette analyse, l'excision est reprise en enlevant une bande de peau saine appelée marge de sécurité plus ou moins importante suivant la taille de la lésion (pour revue Garbe et al. 2010 ; Testori et al. 2009). L'exérèse du ganglion sentinelle n'est pas pratiquée de manière systématique mais est assez fréquente dans le cas de tumeurs profondes. Pour localiser les ganglions sentinelles, le chirurgien injecte un produit coloré ou radioactif au voisinage de la tumeur. Lors de l'opération, un à deux ganglions lymphatiques sont habituellement enlevés. Ils sont ensuite analysés par anatomopathologie. Dans le cas où des micrométastases sont détectées, on procède au curage total des ganglions situés dans la zone de drainage du mélanome primaire (pour revue Garbe et al. 2010 ; Testori et al. 2009). L'exérèse des métastases est également réalisée lorsqu'elles sont accessibles. En cas de métastases trop nombreuses ou trop étendues, la chirurgie n'est plus prioritaire.

4.3 Les traitements par radiothérapie

La radiothérapie est relativement peu utilisée dans le cas du mélanome car le mélanome est communément admis comme une tumeur radio-résistante. Elle est prescrite dans le cas de tumeurs primaires, de ganglions lymphatiques envahis ou de métastases quand les lésions sont peu ou pas accessibles et donc inopérables en chirurgie. C'est notamment le cas des métastases osseuses et cérébrales. La radiothérapie est en général utilisée de façon palliative pour soulager les symptômes comme par exemple dans le cas de métastases osseuses venant comprimer la moelle épinière (pour revue Testori et al. 2009 ; Garbe et al. 2010 ; Khan et al. 2011).

4.4 Les immunothérapies sont utilisées pour les mélanomes de stade II et III

L'immunothérapie est souvent utilisée comme traitement adjuvant (en complément de la chirurgie) pour les mélanomes de stade II et III (pour revue Agarwala et al. 2011).

4.4.1 L'interféron alpha 2b (IFN)

Trois types de traitement ont été testés dans le cas de l'IFN : à faibles doses, à doses intermédiaires et à fortes doses (pour revue, Agarwala and O'Day 2011). A faibles doses, l'IFN n'a pas pu montrer de bénéfice avec une absence d'amélioration de la médiane de survie ou de temps de survie sans reprise de la maladie (pour revue Punt et al. 2001). Les traitements à doses intermédiaires quant à eux n'améliorent pas la médiane de survie de façon significative mais augmentent le temps de survie sans reprise de maladie (Hansson et al. 2011). Enfin le traitement à fortes doses est un traitement approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour les stades II et III. Il permet d'allonger la durée de vie sans reprise de la maladie mais ne modifie pas la survie globale et présente une toxicité assez élevée (pour revue Garbe et al. 2011). Une version de l'interféron pégylé est désormais disponible. Des études récentes tendent à montrer qu'une meilleure sélection des patients pourrait conduire à une amélioration des résultats en termes de survie globale. En effet, des réponses plus encourageantes sont obtenues avec des patients présentant peu de ganglions envahis (stade III-N1) par rapport aux patients III-N2. De même, les patients présentant une ulcération de la tumeur primaire répondent mieux au traitement par l'interféron. Cependant les améliorations de la survie globale obtenus ne sont pas très importants (Eggermont et al. 2008 ; Wheatley et al. 2003).

4.4.2 L'interleukine 2 (IL-2)

Le traitement à hautes doses d'IL-2 est la seule immunothérapie approuvée pour les mélanomes de stade IV par la FDA. On constate une réponse objective de 15,5% à 20% avec une rémission complète dans 5% à 15% des cas (Phan et al. 2001 ; Tarhini et al. 2007). Récemment, des traitements à l'IL-2 administrés par injection intra-tumorale ont montré des résultats encourageants pour des patients présentant des métastases cutanées sans atteinte des ganglions lymphatiques et sans métastases viscérales, avec un taux de réponses objectives de 40% et 30% respectivement pour les stades III et IV (Weide et al. 2011).

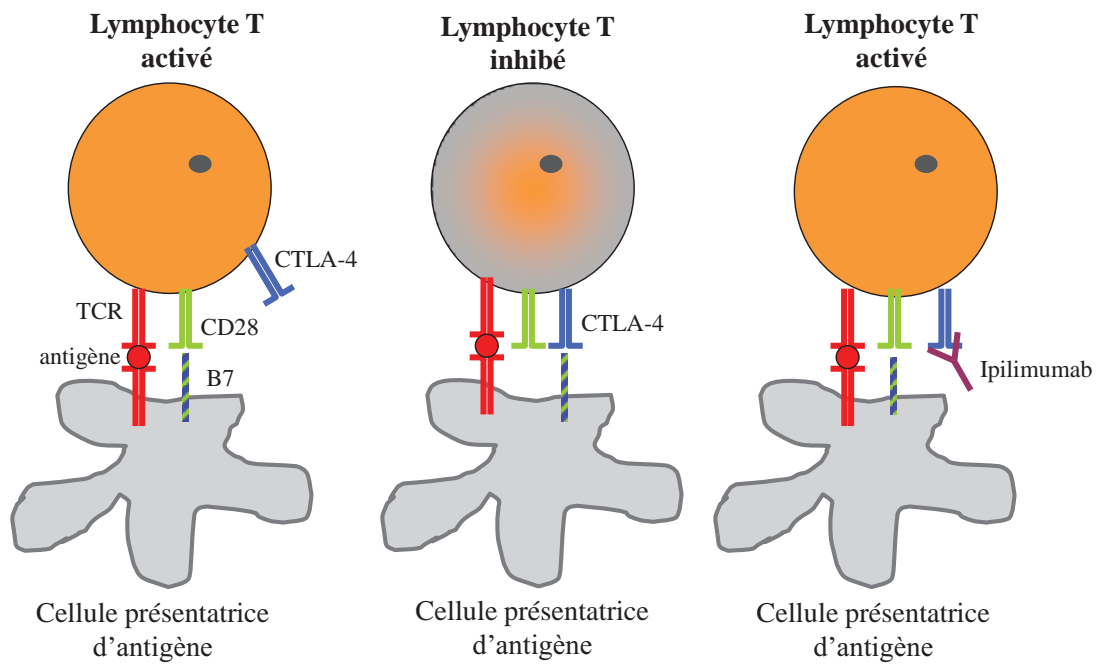


Figure 11 : Mode d'action de l'ipilimumab

La présence d'un anticorps anti-CTLA-4 tel que l'Ipilimumab ou le tremelimumab permet de bloquer l'inhibition des lymphocytes T et donc du système immunitaire induit par la cellule cancéreuse.

4.4.3 Les anticorps monoclonaux anti-CTLA4

La protéine CTLA4 (pour Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T. Il s'agit d'un compétiteur naturel de CD28 pour la liaison au ligand B7 situé sur la surface des cellules présentatrices d'antigènes. L'activation de CTLA4 par le ligand a un effet d'inhibition de l'activation des lymphocytes T et donc de la réponse immune (alors que CD28 a un effet activateur). La stratégie d'un anticorps monoclonal anti-CTLA4 est donc de supprimer l'inhibition des lymphocytes T en espérant induire une meilleure réponse immunitaire contre la tumeur (Robert et al. 2009) (figure 11). Il existe deux anticorps monoclonaux thérapeutiques ciblant CTLA4 : le tremelimumab et l'ipilimumab.

Le **tremelimumab** (CP-675,206 ; Pfizer Inc.) a été testé pour le mélanome dans des études cliniques de phase I/II où le taux de réponses objectives approchait les 10% (Camacho et al. 2009 ; Kirkwood et al. 2010). Dans une étude clinique de phase III, la survie était augmentée mais pas de manière significative (11,76 mois avec le tremelimumab contre 10,71 avec une chimiothérapie de référence) (pour revue Garbe et al. 2011).

L'**ipilimumab** (**Yervoy**) (MDX010 ; Medarex, Inc./Bristol-Myers Squibb) a été testé dans une étude clinique de phase III où la survie était augmentée de façon significative par rapport à une vaccination gp100 (10 mois contre 6,4 mois avec le gp100). Les auteurs notaient 10,9% de réponses objectives (Hodi et al. 2010). Ce composé a d'ores et déjà obtenu une autorisation provisoire d'utilisation (ATU) pour la France en juillet 2011. De nouvelles études sont envisagées pour combiner les traitements à l'ipilimumab et à l'IFN.

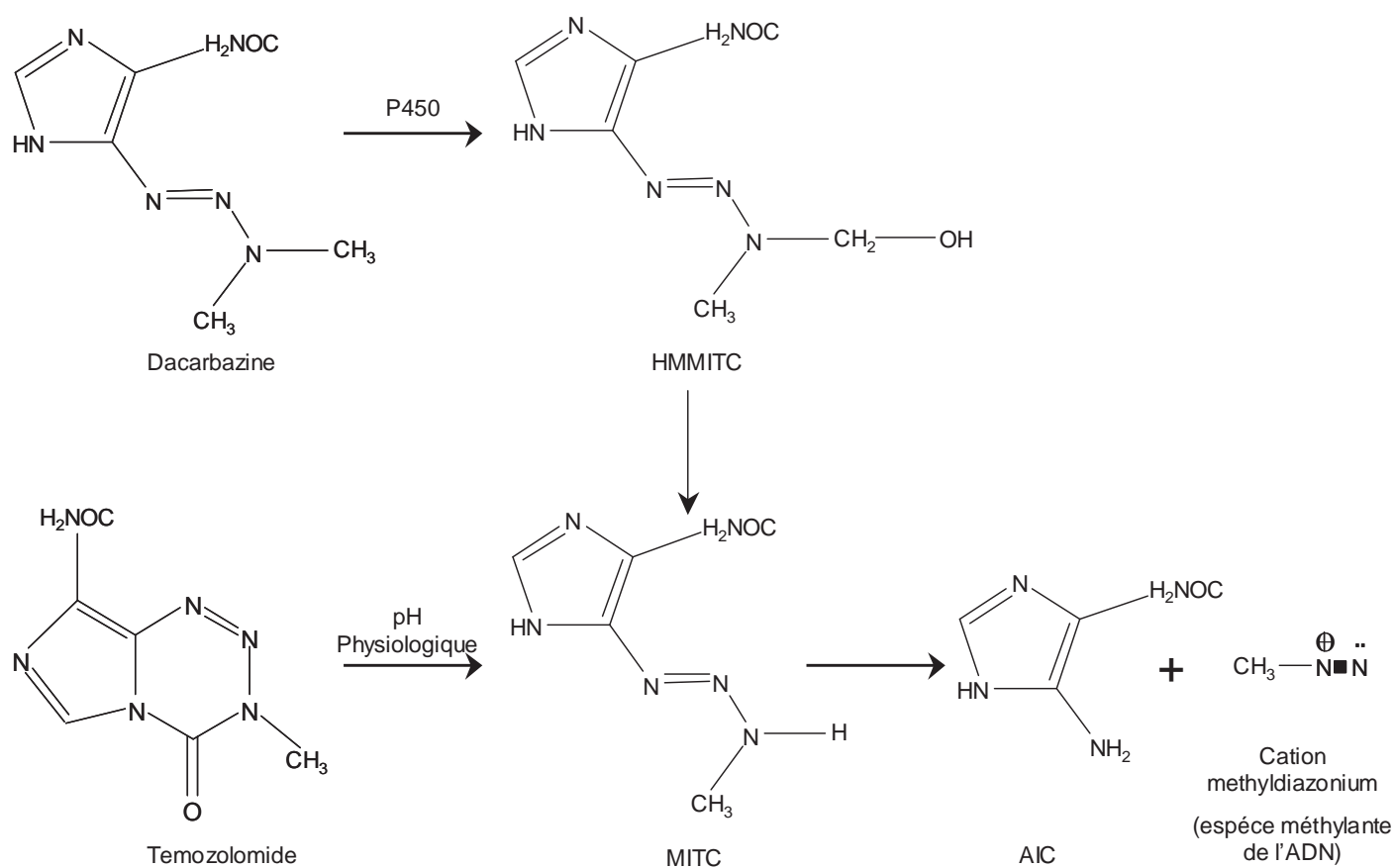


Figure 12 : Métabolisation de la dacarbazine et du temozolomide

La dacarbazine et le temozolomide sont les substances de référence pour le traitement du mélanome métastatique. La métabolisation de ces agents anti-cancéreux est décrite dans le schéma. Ce schéma est adapté de Bei et al. 2010.

4.5 La chimiothérapie classique est utilisée pour les mélanomes de stades IV

La chimiothérapie est réservée au mélanome de mauvais pronostic (stade IV). Un grand nombre d'agents de chimiothérapie classique a été essayé sans résultats sur le mélanome métastatique. Parmi les substances testées, les analogues du platine (cisplatine et carboplatine) entraînent moins de 10 % de réponses objectives et les agents ciblant les microtubules (vinca alkaloïdes et les taxanes) font partie des poly-chimiothérapies. Les agents alkylants tels que la dacarbazine ou le temozolomide sont les composés actuellement les plus utilisés malgré un bénéfice très limité pour les patients (pour revue Bhatia et al. 2009 ; Jilaveanu et al. 2009).

4.5.1 La dacarbazine (Déticène®)

La dacarbazine (ou DTIC pour dimethyl-triazeno-imidazole-carboxamide) est un agent alkylant. Pour être actif, la dacarbazine doit tout d'abord être convertie en MTIC (monomethyl triazene : 5-(3-methyl-1-triazeno)imidazol-4-carboxamide). Cette espèce est très instable et réagit avec l'eau pour libérer l'AIC (5-aminoimidazol-4-carboxamide) et le cation methyldiazonium qui spontanément produit une espèce méthylante de l'ADN très réactive : le CH_3^+ (figure 12) (pour revue Bei et al. 2010). L'effet biologique majeur provoqué par l'action du DTIC sur l'ADN est l'attaque du groupe méthyl à la position O⁶ de la guanine car la persistance d'un tel adduit s'il n'est pas pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN est hautement mutagène pour la cellule puisque la guanine ainsi méthylée en O⁶ (O⁶-meG) est remplacée par une thymine durant la réplication de l'ADN, ce qui conduit après deux cycles de division cellulaire à une substitution G:C → T:A. L'adduit le plus fréquemment provoqué par l'action de la dacarbazine sur l'ADN est une méthylation de la guanine : N⁷-methylguanine (N⁷-meG). Les adénines et cytosines peuvent également être modifiées par l'action du DTIC avec la formation d'adduit N³-methyladénine (N³-meA) et N³-methylcytosine (N³-meC) (pour revue Bei et al. 2010). Les voies de réparation de l'ADN et leur implication dans la réparation des adduits causés par la dacarbazine seront évoquées dans le paragraphe sur les mécanismes de résistance du mélanome à la chimiothérapie.

La dacarbazine est le seul agent chimiothérapeutique approuvé par la FDA pour les mélanomes de stades IV. Il s'administre par injection et différents schémas d'administration ont été testés depuis 1970. Il fut d'abord décrit dans une première étude pour avoir 25% de

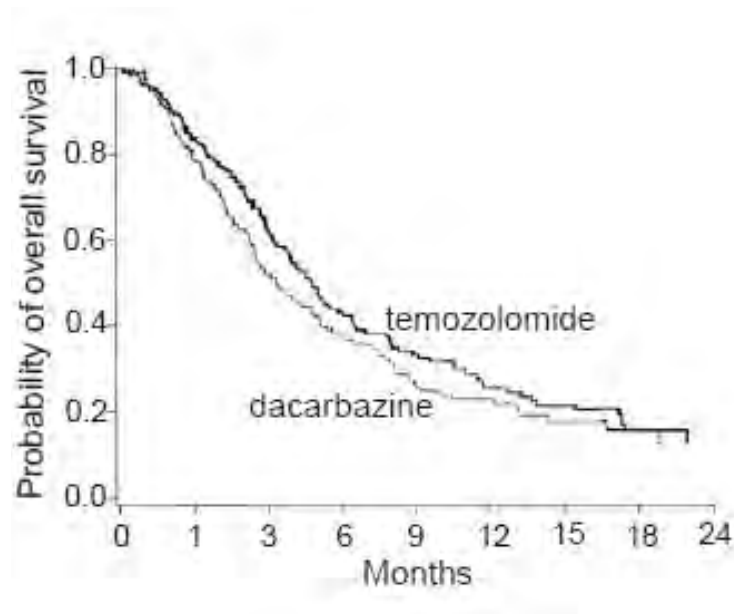


Figure 13 : Comparaison de la survie après traitement à la dacarbazine et au temozolomide

La courbe de survie correspondant à la comparaison de la dacarbazine avec le temozolomide est présentée dans ce graphique. Ce graphique est tiré de Middleton et al. 2000.

réponses objectives mais une étude plus récente et menée à plus grande échelle a depuis montré que le taux de réponses objectives était de 12% avec un taux de rémission complète d'environ 4 à 5% et une médiane de durée de réponse de 5 à 6 mois seulement (pour revue, Serrone et al. 2000). La dacarbazine a également été testée en combinaison avec le cisplatine (CDDP) mais cette association n'a pas montré d'amélioration ni du taux de réponses objectives, ni de la survie des patients (pour revue, Serrone et al. 2000). Un essai clinique a récemment été entrepris en association avec l'ipilimumab par rapport à la dacarbazine seule. Cette étude a, pour la première fois, conclu à une augmentation de la survie globale pour des patients atteints de mélanome métastatique (Robert et al. 2011).

4.5.2 Le temozolomide (témodal®)

Le temozolomide (8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one) est une pro-drogue administrée par voie orale mais ayant le même mode d'action que la dacarbazine (pour revue Bei et al. 2010) (figure 12). Une étude clinique de phase III a montré un taux de réponse objective de 21% et une activité équivalente à celle de la dacarbazine (Middleton et al. 2000). La durée de survie sans progression de la maladie est significativement plus importante bien que restant très faible avec 1,9 mois pour le temozolomide contre 1,5 mois pour la dacarbazine (figure 13). De plus ce dernier permettrait une amélioration de la qualité de vie des patients en comparaison de la dacarbazine (Middleton et al. 2000 ; Kiebert et al. 2003). Une étude plus récente a confirmé que le temozolomide n'apportait pas de bénéfice supplémentaire par rapport à la dacarbazine (Patel et al. 2011). Le temozolomide a également été testé en combinaison avec l'IFN dans une étude de phase III et le groupe ayant reçu le traitement au temozolomide associé à l'IFN a montré un taux de réponses objectives significativement plus important que le groupe ayant reçu le temozolomide seul avec 24,1% contre 13,4% respectivement. Le temozolomide n'est pas approuvé par la FDA dans le cas du mélanome métastatique mais seulement dans le cas du glioblastome multiforme en parallèle de la radiothérapie et pour le traitement des astrocytomes anaplasiques réfractaires car le temozolomide est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Il est cependant approuvé par plus de vingt pays à travers le monde pour le traitement du mélanome métastatique et notamment en cas de métastases cérébrales. Le temozolomide, tout comme la dacarbazine, n'a qu'un effet limité puisque seuls 1 à 2% des patients montrent une réponse durable à long terme et aucun effet n'a été montré sur la survie globale des patients (pour revue Garbe et al. 2011).

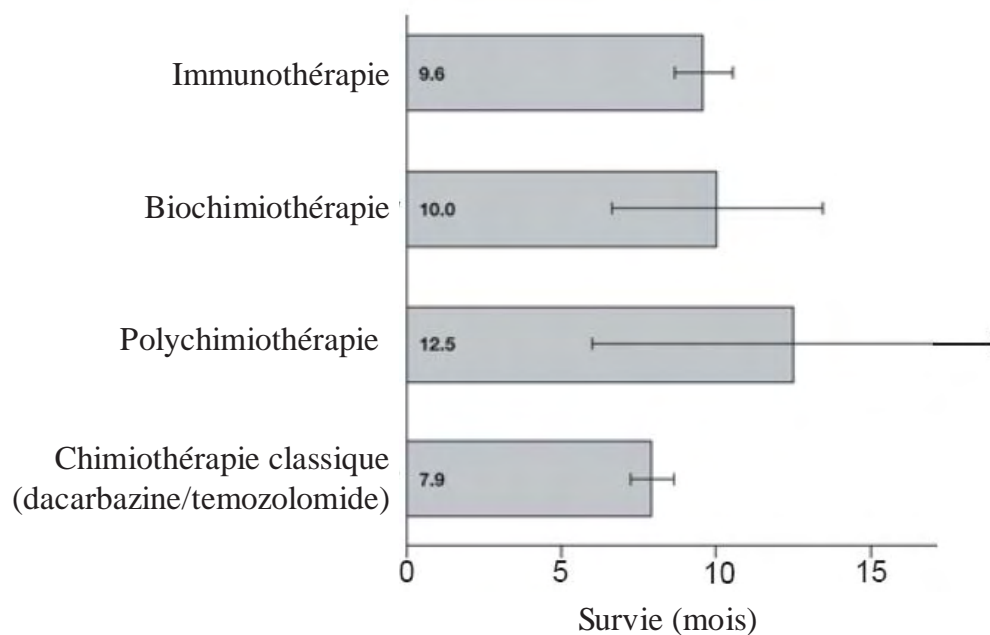


Figure 14 : Comparaison de la survie de patients en fonction du type de traitement

La survie des patients en fonction du type de traitement suivi est donnée dans le graphique. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%. La biochimiothérapie représente les combinaisons entre chimiothérapie classique (dacarbazine, cisplatine ou vinblastine) et immunothérapie (IFN ou IL-2). Ce graphique est issu de Garbe et al. 2011.

4.5.3 Les dérivés nitroso-urées

Une autre classe d'agents alkylants testés dans le cas du mélanome métastatique est la famille des dérivés nitrosourées tels que la fotemustine (*Muphoran*®), la carmustine (BCNU, *BICNU*®), la lomustine (CCNU, *Bélustine*®) ou encore la semustine (methyl-CCNU). Ces agents sont lipo-solubles et ont donc été envisagés pour le traitement des métastases cérébrales pour leur potentiel à franchir la barrière hémato-encéphalique.

La **fotemustine** (développée par Servier) est le seul composé de cette famille utilisé en clinique dans le cas de métastases cérébrales. Une étude a montré une réponse objective de 15,2 % contre 6,8% pour la dacarbazine mais pas d'allongement de la survie globale (Avril et al. 2004). Les associations entre fotemustine et dacarbazine ont montré des taux de réponses plus importants (entre 11,7 et 33%) mais sans amélioration de la durée de survie et accompagné de toxicités très variables (pour revue, Serrone et al. 2000).

La **carmustine** seule n'a pas montré un taux de réponse supérieur à celui de la dacarbazine avec environ 20% de réponses objectives (Jones et al. 1992). Deux études se sont ensuite penchées sur l'association entre la carmustine et la dacarbazine sans pouvoir montrer de différences dans les taux de réponse (pour revue Serrone et al. 2000).

4.5.4 Les polychimiothérapies

Plusieurs types d'association entre agents chimiothérapeutiques ont été essayés. Les premières testées furent les **BOLD** (bléomycine/vincristine/lomustine/dacarbazine) et les **BELD** (bléomycine/vindesine/lomustine/dacarbazine). Les taux de réponses objectives varient entre 2 et 45% suivant les études. L'association **CVD** (cisplatine/vinblastine/ dacarbazine) fut ensuite extensivement étudiée et le taux de réponses objectives observées varie entre 25 et 45% suivant les études. Enfin, l'association **CBDT** (dacarbazine/carmustine/cis-platin/tamoxifène), aussi appelée "Dartmouth regimen" fut plus récemment étudiée et montre des taux de réponses objectives entre 10 à 30% suivant les études (pour revue Serrone et al. 2000). Globalement les polychimiothérapies n'ont pas réussi à apporter la preuve d'une différence significative de leur action par rapport à une monochimiothérapie (figure 14) (pour revue Garbe et al. 2011). De plus, la toxicité est nettement plus élevée avec ce type de stratégie thérapeutique. A ce jour, les polychimiothérapies ne sont donc pas utilisées pour le traitement du mélanome métastatique.

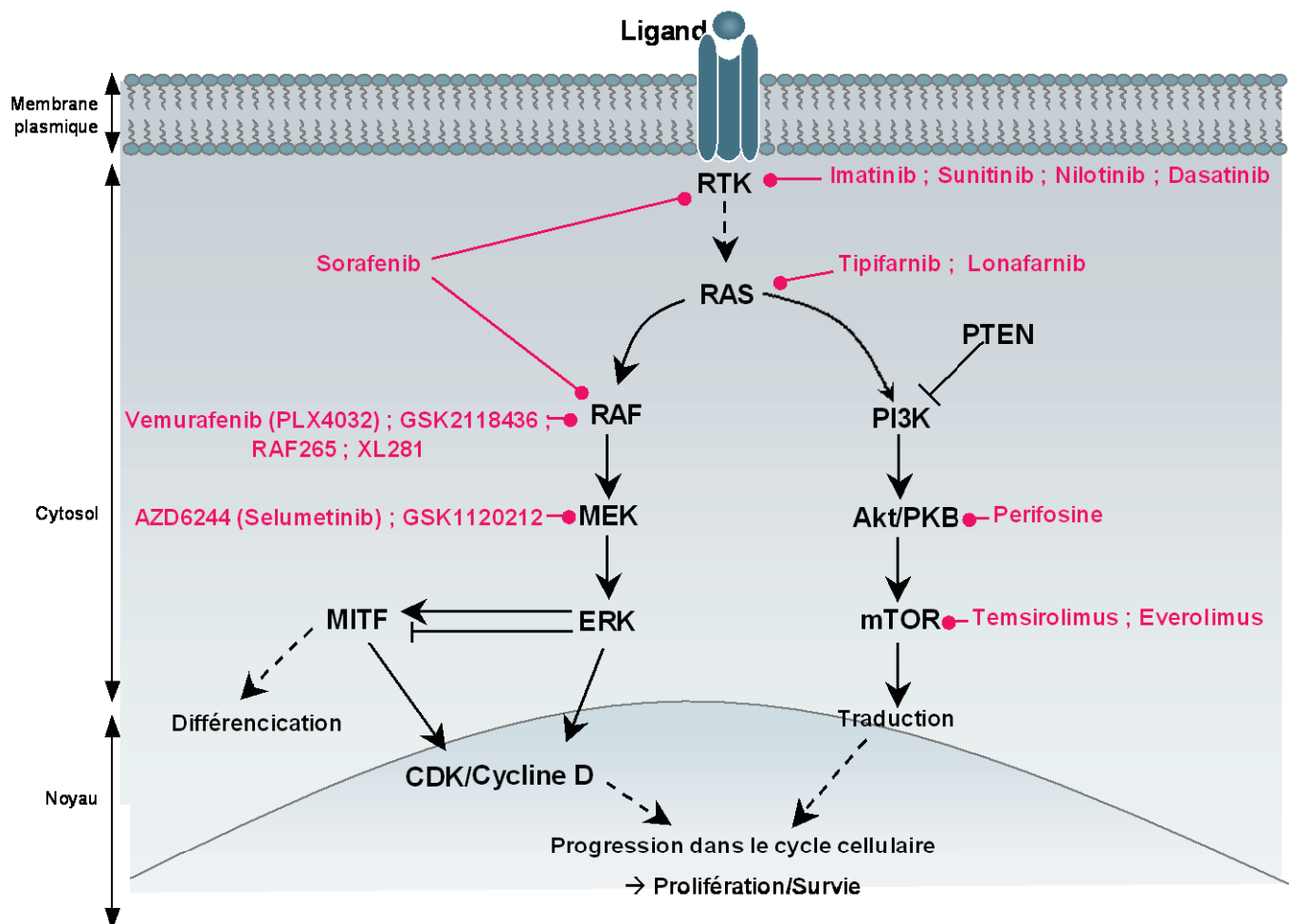


Figure 15 : Les nouveaux agents de thérapies ciblées développés dans le cas du mélanome

Les nouvelles stratégies de thérapies ciblées s'attaquent aux voies de signalisation fréquemment mutées dans les cancers. Dans le cas du mélanome, la voie des MAP kinases est fortement dérégulée. Différents inhibiteurs pharmacologiques ciblant les acteurs de cette voie ont donc été développés. Ils sont inscrits en rouge sur le schéma.

4.6 Les thérapies ciblées : l'avenir des traitements anti-mélanome

La stratégie des thérapies ciblées est de plus en plus explorée dans de nombreux cancers. Il s'agit de cibler spécifiquement des protéines ou des voies de signalisation connues pour être mutées et/ou dérégulées dans un cancer donné et ainsi épargner les cellules saines de l'organisme. Dans le cas du mélanome, les voies des MAPK et PI3K/AKT sont particulièrement dérégulées (80 % des cas) et de nombreux inhibiteurs spécifiques ciblant cette voie ont été testés avec parfois des résultats très encourageants (pour revue Singh et al. 2008 ; Seetharamu et al. 2009 ; Davies et al. 2010) (figure 15).

4.6.1 Les inhibiteurs de la voie PI3K/AKT

La **perifosine** (Aeterna Zentaris) est un composé ciblant la protéine AKT pour lequel une phase II a été menée (pour revue Fecher et al. 2007). Cette étude n'a pas permis d'envisager un essai de phase III en raison de l'absence de réponse objective (Ernst et al. 2005).

Le **temsirolimus** (Torisel®, Wyeth-Ayerst) et l'**everolimus** (Zortress®, Novartis) sont des inhibiteurs de mTOR qui ont été testés en essais cliniques de phase II (pour revue, Fecher et al. 2007). Aucun essai de phase III ne sera entrepris dans le cas du temsirolimus car aucun bénéfice clinique n'a été noté en phase II (Margolin et al. 2005).

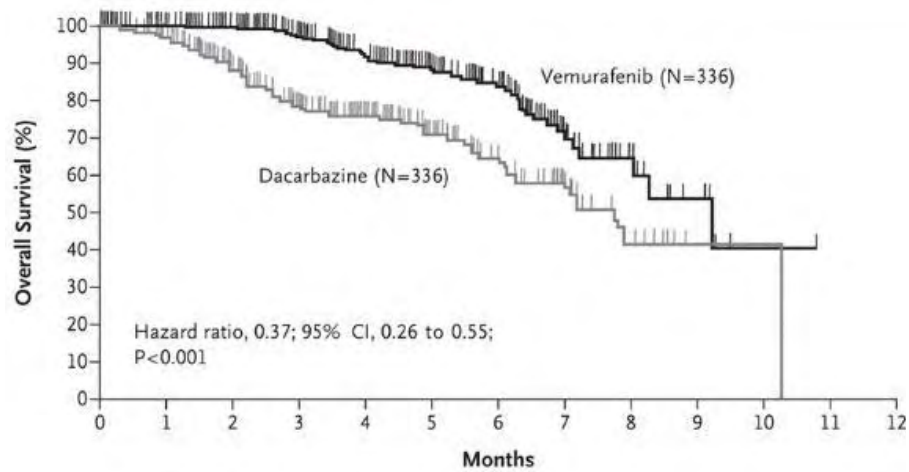
4.6.2 Les inhibiteurs de récepteurs à tyrosine kinase

L'**Imatinib** (Glivec®, Novartis) est un inhibiteur de tyrosine kinase. Il est actif contre les protéines bcr-abl, c-KIT, PDGFR- α (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) et les tyrosines kinases. c-KIT (CD117) est le récepteur du ligand SCF (Stem Cell Factor) qui permet de transduire des signaux de prolifération et de survie par des voies de signalisation classiques telles que les voies PI3K ou MAPK. Il est exprimé à la surface de nombreux cancers dont le mélanome. Pourtant son inhibition par l'imatinib n'a pas donné de résultat en clinique puisqu'une étude de phase II a montré des résultats encourageants (pour revue Eggermont et al. 2011).

4.6.3 Les inhibiteurs de RAS

Deux inhibiteurs de RAS sont actuellement en essai clinique avec d'une part le **Tipifarnib** (Zanestra®, Johnson and Johnson) et d'autre part le **Lonafarnib** (Sarasar®, Schering-Plough) tous deux testés en essai de phase I sur plusieurs tumeurs solides sans résultats probant pour le mélanome (pour revue, Fecher et al. 2007).

A.



B.

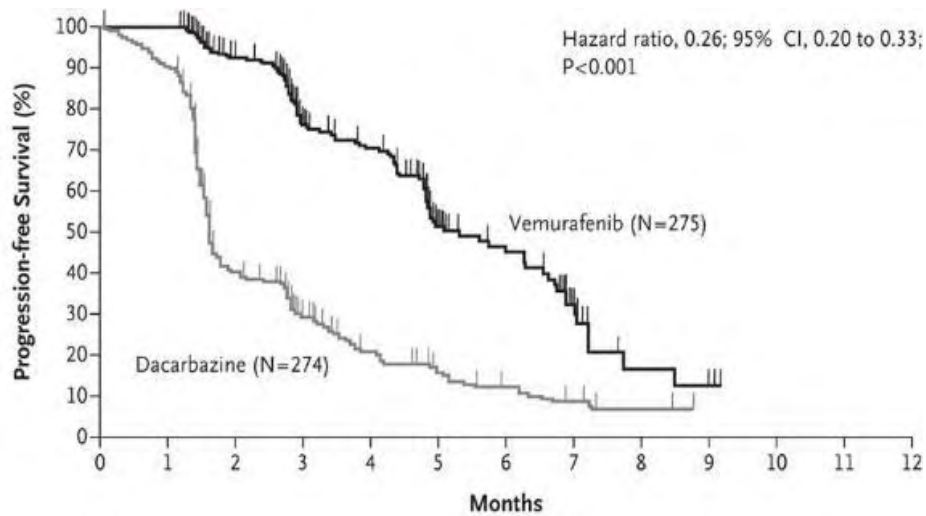


Figure 16: Les résultats des essais cliniques de phase III obtenus avec le vemurafenib

Le vemurafenib est un composé qui cible spécifiquement les cellules tumorales portant la mutation V600E pour BRAF. Le taux de réponse avec ce nouvel agent anti-cancéreux est très prometteur puisqu'il atteint les 80%. Les graphiques tirés de Chapman et al. 2011 montrent respectivement la survie globale (A.) et le temps de survie sans reprise de la maladie (B.) en comparaison avec la dacarbazine.

4.6.4 Les inhibiteurs de RAF

Plusieurs inhibiteurs de la kinase BRAF ont été testés pour le traitement du mélanome car comme cela a été évoqué précédemment cette voie de signalisation conduisant à la prolifération et la survie des cellules est très fréquemment dérégulée dans les mélanomes.

Le **sorafenib** (Nexavar®, BAY43-9006 ; Bayer HealthCare Pharmaceutical Inc., et Onyx Pharmaceutical Inc.) est un composé administré par voie orale qui inhibe plusieurs tyrosines kinases dont les kinases RAF (IC₅₀ de 6mM pour CRAF, 22mM pour BRAF sauvage et 38mM pour BRAF^{V600E}), PDGFRβ (IC₅₀ de 57mM), VEGFR (IC₅₀ de 90mM pour VEGFR2 et 20mM pour VEGFR3) et c-KIT (IC₅₀ de 68mM). Des essais cliniques de phase III ont été entrepris pour le mélanome mais ce composé n'a pas montré de bénéfice avéré (Eggermont and Robert 2011). Plus récemment, des essais cliniques de phase I ont également été menés en combinaison avec une chimiothérapie classique (dacarbazine ou carboplatin et paclitaxel) (Hauschild et al. 2009 ; Eisen et al. 2011 ; Brendel et al. 2011 et pour revue, Puzanov et al. 2010 ; Arkenau et al. 2011).

Le **PLX-4032/RG7204 (Vemurafenib)** (Zelboraf®, Hoffmann-La Roche et Plexxikon Inc.) est un inhibiteur de BRAF (IC₅₀ de 100mM pour BRAF sauvage) spécifique du mutant V600E (IC₅₀ de 31mM) porté par 50% des mélanomes. Ce composé a été évalué récemment en phase I et montre des résultats très encourageants sur des patients portant les mutations V600E ou V600K pour BRAF avec 81% de réponses objectives (26 patients sur 32) dont 24 réponses partielles et 2 réponses complètes (Flaherty et al. 2010). Une phase III a également été menée en comparaison avec la dacarbazine avec de très bons résultats (figure 16) (Chapman et al. 2011). Ce composé a d'ailleurs déjà obtenu une autorisation provisoire d'utilisation (ATU) pour la France en juillet 2011. Malgré ces résultats positifs, une résistance acquise apparaît assez rapidement après 2 à 18 mois de traitement. Les mécanismes de résistance à ce composé sont actuellement en cours d'étude et il a déjà été montré que la résistance ne serait pas due à l'apparition de mutation secondaire de la kinase BRAF comme cela a été montré pour l'imatinib (Nazarian et al. 2010). Il a également été avancé que la résistance pourrait être liée à l'activation de PDGFRβ et NRAS en amont de BRAF (Nazarian et al. 2010 et pour revue Roukos 2011), de l'activation d'isoformes alternatives de BRAF (Villanueva et al. 2010) ou de l'activation de MEK en aval de BRAF par la mutation de la cystéine en position 121 par une sérine (C121S) (Wagle et al. 2011). La

compréhension de cette résistance constitue un pré-requis indispensable à l'amélioration et la mise en place clinique de ces thérapies ciblées.

Le **GSK2118436** (GlaxoSmithKline PLC) est un inhibiteur réversible de BRAF (sauvage et des mutant V600E, V600K et V600D) et de CRAF actuellement en essai clinique de phase I/II et les premiers résultats font état d'un taux de réponse de 63%. Une phase III est en cours (pour revue, Puzanov and Flaherty 2010 ; Arkenau et al. 2011 ; Eggermont and Robert 2011).

Le **RAF265** (Novartis), un autre inhibiteur de BRAF, est aujourd'hui en essai clinique de phase I/II pour le mélanome (pour revue, Puzanov and Flaherty 2010 ; Arkenau et al. 2011 ; Eggermont and Robert 2011).

Le **XL281** (Bristol-Myer Squibb, Exelixis) est un inhibiteur administré par voie orale de BRAF (sauvage et muté V600E) et de CRAF. Ce composé est actuellement en cours de phase I/II pour le mélanome avec un bénéfice clinique de 43% (Schwartz et al. 2009 et pour revue, Puzanov and Flaherty 2010 ; Arkenau et al. 2011).

Etant donné les résultats encourageants obtenus notamment avec le Vemurafenib, des combinaisons entre des inhibiteurs de BRAF et l'ipilimumab ou des inhibiteurs de MEK sont déjà envisagées et en cours de test. Ces combinaisons ont pour objectif de contrer les résistances observées en activant l'immunité d'une part (ipilimumab) ou en empêchant l'activation de voies de signalisation parallèles (inhibiteurs de MEK).

4.6.5 Les inhibiteurs de MEK

L'**AZD6244** (Selumetinib, ARRY-142886 ; Astra Zeneca) est un inhibiteur de la kinase MEK1/2 appartenant à la même voie de signalisation que BRAF et qui cible donc également les patients présentant une mutation sur BRAF. Ce composé a été testé en phase II en comparaison avec la dacarbazine pour des patients de stades II et IV. Les premiers résultats semblent montrer des réponses pour des patients mutés BRAF avec deux réponses complètes et six réponses partielles sur vingt patients mutés pour BRAF et deux réponses partielles sur vingt-deux patients sans mutation de BRAF (pour revue Eggermont and Robert 2011).

Nom commercial du composé	Autres noms	Fournisseur	cible	Année d'obtention de l'AMM
Introna	Interferon alpha à forte dose	Schering Plough	-	AMM en 2000
Interleukine 2	-	-	-	pas d'AMM pour la France
Tremelimumab	-	Pfizer Inc.	CTLA-4	Essai Clinique de phase III négatif
Yervoy	ipilimumab	Medarex Inc. et Bristol-Myers Squibb	CTLA-4	ATU en 2011
Déticène	dacarbazine	Bayer	ADN	AMM en 1975
Témodal	tenozolomide	Schering Plough	ADN	pas d'AMM pour la France
Muphoran	fotemustine	Servier	ADN	AMM en 1989
Carmustine	-	Bristol-Myers Squibb	ADN	AMM en 2009
Belustine	lomustine	Prostrakan	ADN	AMM en 2001
Perifosine	-	Aeterna Zentaris	AKT	Essai Clinique de phase II négatif
Torisel	tensirolimus	Wyeth-Ayerst	mTOR	Essai Clinique de phase II négatif
Glivec	imatinib	Novartis	c-KIT	Essai Clinique de phase II positive
Zanestra	tipifarnib	Johnson and Johnson	RAS	En cours d'essais clinique de phase I
Sarasar	lonafarnib	Schering Plough	RAS	En cours d'essais clinique de phase I
Nexavar	sorafenib	Bayer et Onyx	BRAF	Essai Clinique de phase III négatif
Zelboraf	vemurafenib/PLX4032	Hoffmann-La Roche et Plexikon	BRAF ^{V600E}	ATU en 2011
GSK2118436	-	GlaxoSmithKline	BRAF muté	En cours d'essais clinique de phase II
RAF265	-	Novartis	BRAF	En cours d'essais clinique de phase I/II
XL281	-	Bristol-Myers Squibb et Exelixis	BRAF	En cours d'essais clinique de phase I/II
Selumetinib	AZD6244	Astra Zeneca	MEK	En cours d'essais clinique de phase I/II
GSK1120212	-	GlaxoSmithKline	MEK	En cours d'essais clinique de phase III

Tableau 7 : Récapitulatif des traitements du mélanome métastatique

Les différents agents pharmacologiques disponibles pour le traitement du mélanome métastatique sont présentés avec leur cible, fournisseur ainsi que la date de mise sur le marché.

Le **GSK1120212** (GlaxoSmithKline PLC) est un inhibiteur de MEK et un essai de phase III en combinaison avec le GSK2118436 (inhibiteur de BRAF) est en cours de recrutement des patients (pour revue, Arkenau et al. 2011 ; Eggermont and Robert 2011).

Des inhibiteurs agissant directement sur les effecteurs en aval des voies de signalisation des MAPK et PI3K/AKT sont également en cours de développement avec notamment des inhibiteurs de CDK (Cyclin-Dependent Kinase) (flavopiridol, PD-033-0332991 et l'AG-024322) (pour revue, Fecher et al. 2007).

Avant l'apparition de la nouvelle génération des thérapies ciblées, le traitement du mélanome n'avait pas progressé depuis plusieurs dizaines d'années et aucune chimiothérapie n'avait permis d'améliorer la survie globale des patients une fois le stade métastatique atteint (tableau 7). Les solutions thérapeutiques commencent donc à voir le jour souffrant pourtant toujours du caractère très chimiorésistant du mélanome. L'amélioration des traitements par les thérapies ciblées et le développement de cibles pharmacologiques innovantes sont donc dépendants de la compréhension de l'échec thérapeutique et des mécanismes de la chimiorésistance de ce cancer.

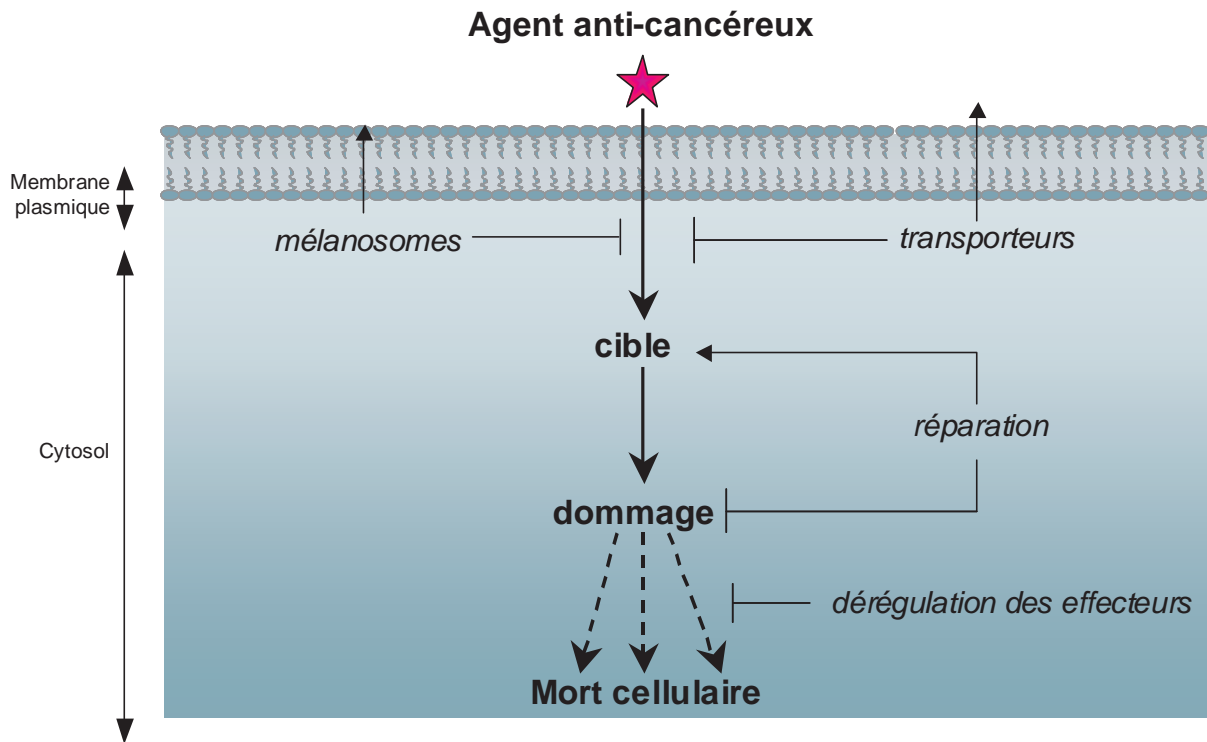


Figure 17 : Les mécanismes cellulaires de la chimiorésistance

Les mécanismes cellulaires intervenant dans la résistance des cellules tumorales de mélanomes à la chimiothérapie sont nombreux et variés. La résistance peut émaner d'une mauvaise incorporation de la drogue par la cellule, d'une réparation des cibles endommagées ou encore d'une dérégulation des voies de signalisation conduisant à la mort. Ces différents mécanismes sont représentés dans le schéma.

LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME

METASTATIQUE : MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES

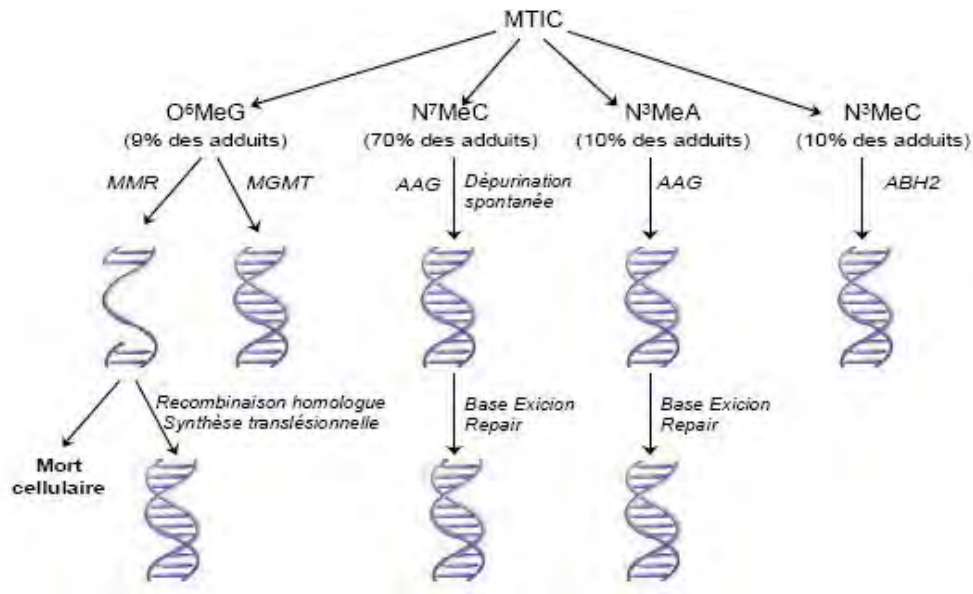
La plupart des agents anti-cancéreux sont des médicaments à faible index thérapeutique, la fenêtre entre la dose curative et la dose toxique étant très étroite. La moindre modification de sensibilité des cellules cancéreuses peut donc entraîner l'inefficacité du traitement.

Les processus biologiques provoquant cette résistance sont très variés. Le premier grand mécanisme intervient au niveau du transport du produit jusqu'aux cellules cancéreuses. Parmi ces mécanismes, on retrouve l'influence du micro-environnement avec notamment la vascularisation, la diffusion et l'hypoxie, on retrouve également la pharmacocinétique avec la métabolisation et l'élimination des substances ainsi que la faible activation métabolique dans le cas de pro-drogues.

Une fois le composé cytotoxique arrivé en contact avec la cellule cancéreuse, des processus cellulaires permettant d'échapper à l'action du produit se mettent également en place. Les mécanismes cellulaires sont divers et touchent toutes les étapes de l'action de la substance en commençant par l'entrée de la substance dans la cellule avec la mise en place de systèmes d'efflux (transporteurs ABC). Une résistance aux effets directs sur la cible ainsi qu'aux effets secondaires comme l'arrêt de cycle cellulaire ou la mort par apoptose est également présente (figure 17).

Dans cette étude nous nous intéresserons plus particulièrement aux mécanismes cellulaires de résistance. Dans le cas du mélanome, on rencontre des voies de chimiorésistance classiques retrouvées dans d'autres types tumoraux telles que les voies de réparation de l'ADN ou de résistance à l'apoptose. Le mélanome a également des voies de résistance qui lui sont propres et qui dérivent de son affiliation à la lignée mélanocytaire avec notamment la voie de la mélanogénèse.

A.



B.

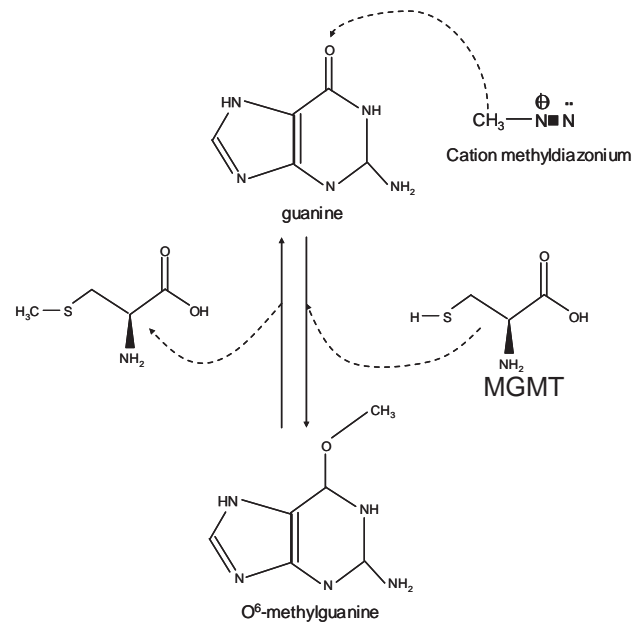


Figure 18 : La résistance aux agents alkylants par les voies de réparation de l'ADN

A. La dacarbazine et le temozolomide (dont la première étape de métabolisation conduit à la production de MTIC) sont des agents alkylants qui ciblent l'ADN des cellules tumorales. Les différents adduits provoqués par l'action sur l'ADN de la dacarbazine et du temozolomide sont décrits dans le schéma. Il est précisé la fréquence d'apparition de ces adduits ainsi que les voies de réparation de l'ADN impliquées dans leur réversion.

B. Les agents alkylants ciblent l'ADN des cellules tumorales. La voie de réparation de l'ADN est donc particulièrement impliquée dans la chimiorésistance du mélanome. La voie de réversion directe des adduits par la méthylguanine- DNA méthyltransférase (MGMT) est particulièrement utilisée par les cellules de mélanome.

1 LES DIFFERENTES VOIES IDENTIFIEES DANS LA RESISTANCE DU MELANOME

1.1 Les voies de réparation de l'ADN permettent de résister aux agents alkylants

De nombreux agents chimio-thérapeutiques ciblent les cellules proliférantes en s'attaquant à la phase de réplication de l'ADN. On trouve ainsi de nombreuses substances cytotoxiques ayant l'ADN pour cible avec principalement les agents alkylants (figure 18 A.), les antracyclines ou encore les dérivés du platine. Les voies de réparation de l'ADN sont donc un des mécanismes récurrents dans la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie, notamment dans le cas du mélanome avec l'usage d'agents alkylants tels que la dacarbazine ou le témozolomide.

1.1.1 Voie de la réversion directe par la MGMT

La voie de réparation la plus directe est la réversion des adduits. La MGMT (pour O(6)-methylguanine-DNA methyltransférase) est une enzyme capable de réparer spécifiquement les adduits O6-méthylguanine provoqués par l'action d'agents alkylants comme la dacarbazine ou le temozolomide (figure 18 B.). *In vitro* sur des lignées résistantes à la fotemustine, une sur-expression de la MGMT a été mise en évidence (Lage et al. 1999 ; Christmann et al. 2001). Des études corrélatives ont donc ensuite été menées pour établir un lien entre la réponse thérapeutique aux agents alkylants et le niveau d'expression de la MGMT. Une étude a montré une corrélation inverse entre le niveau d'expression de la MGMT et le taux de réponse clinique tous traitements confondus (Ma et al. 2003). Cependant, si une tendance similaire a été trouvée en examinant seulement les réponses à la dacarbazine, aucune différence significative n'a pu être montrée. Concernant le temozolomide, le niveau d'expression de la MGMT n'a pas été relié à la réponse clinique (Middleton et al. 1998). Dans des travaux menés *in vitro* sur des lignées de mélanomes, une sur-expression de la MGMT a conduit à une augmentation de la résistance à divers agents (fotemustine, carmustine) (Passagne et al. 2003; Passagne et al. 2006). Cependant il a été envisagé d'associer un inhibiteur de MGMT au témozolomide pour le traitement du mélanome (Jiang et al. 2011). Une étude avait d'ailleurs été menée dans cette perspective sur des modèles de xenogreffes chez la souris et avait montré que l'association du témozolomide avec un inhibiteur de

MGMT, le O⁶-benzylguanine, permettait une plus grande réponse qu'avec le témozolomide seul avec en contre-partie une plus grande toxicité (Wedge et al. 1997).

1.1.2 Autres voies de réparation de l'ADN impliquées dans la chimiorésistance

D'autres voies de réparation de l'ADN ont été impliquées dans la résistance de nombreux cancers telle que la voie de réparation par excision de nucléotide (NER pour Nucleotide Excision Repair) notamment dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules avec l'implication d'ERCC1 ou encore de la réparation par excision de base (BER pour Base Excision Repair). La voie de réparation des mésappariements (MMR pour MisMatch Repair) a également été mise en cause et associée à la résistance à de nombreux composés. Cependant peu d'études ont été menées sur le mélanome. Plusieurs protéines du MMR dont hMSH2, hMLH1 et hMSH6 ont été trouvées sous-exprimées dans des lignées résistantes de mélanomes à l'étoposide, la vindésine ou le cisplatine (Lage et al. 1999). Une étude a également montrée une augmentation de la voie du BER dans des lignées résistantes à la fotemustine ou au cisplatine (Runger et al. 2000). Cette même étude a montré que la voie du MMR était sous-réglée dans ces lignées résistantes.

1.2 L'altération de la sensibilité à l'apoptose est particulièrement importante dans le mélanome

La plupart des chimiothérapies ont pour objectif ultime la mort des cellules cancéreuses par apoptose. Les mélanocytes sont naturellement plus résistants à l'apoptose et supportent sans atteinte majeure les dommages générés par les rayonnements ultraviolets. Cette résistance à l'apoptose est principalement due à une sur-expression de BCL-2 (pour revue Rass et al. 2009). L'endothelin-1 et les mélanocortines ont également été impliquées comme facteurs de survie (pour revue Rass and Hassel 2009). Cette particularité est retrouvée dans le mélanome et sa résistance à l'apoptose est ainsi beaucoup plus importante que dans d'autres types de cancers tels que les carcinomes comme en témoigne l'indice mitotique sur des coupes histologiques de patients (Mooney et al. 1995). De plus, des lignées de mélanomes résistantes à l'étoposide ou au cisplatine présentent une altération de la réponse à l'apoptose (Helmbach et al. 2002). Ce manque de sensibilité à l'apoptose semble principalement lié à la sur-expression des protéines anti-apoptotiques BCL-2, MCL-1 et BCL-XL (Leiter et al. 2000 ; Zhuang et al. 2007) et à la sous-expression des protéines pro-apoptotiques BAX et BAK

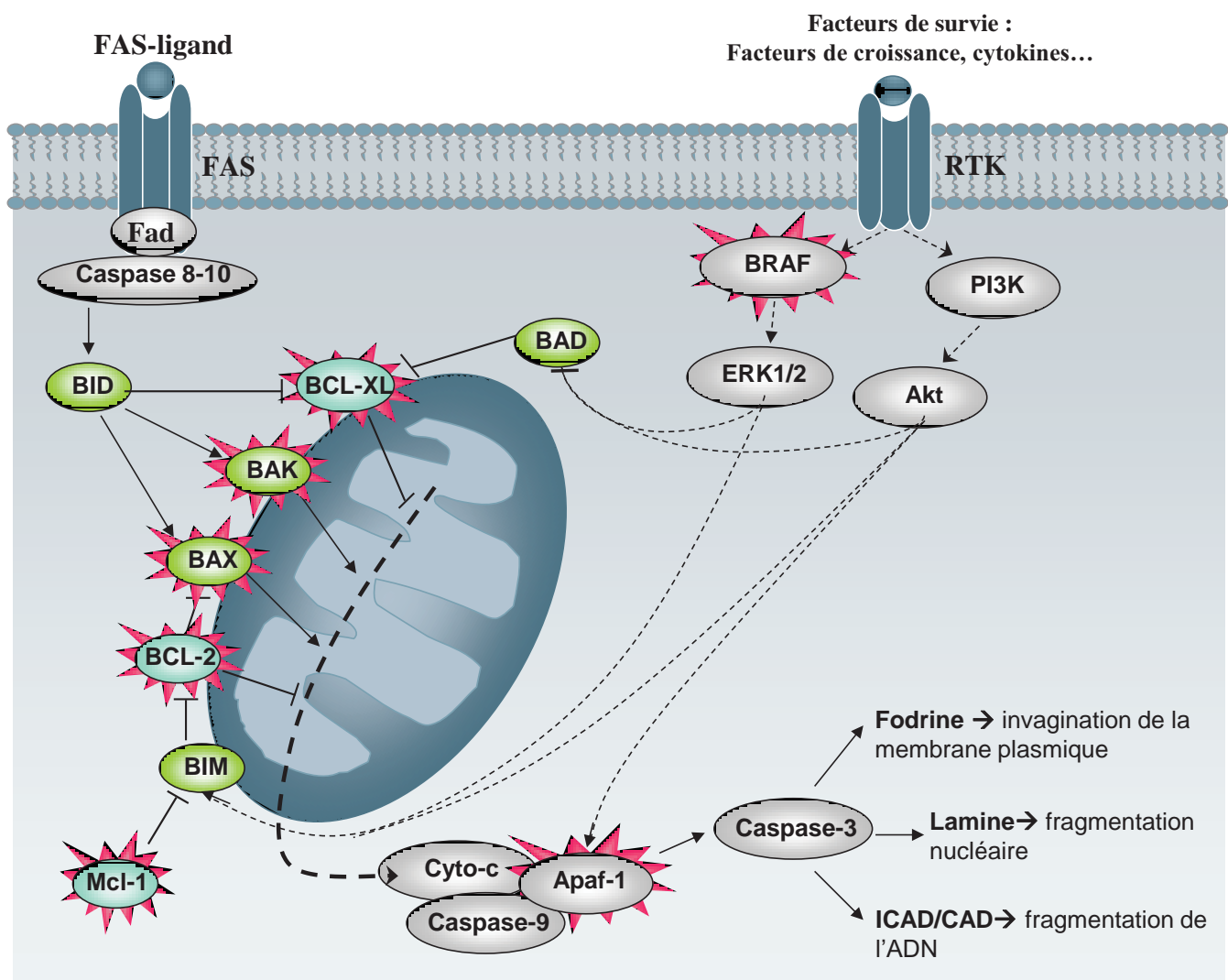


Figure 19 : Les voies apoptotiques sont dérégulées dans le mélanome et induisent une chimiorésistance

La finalité de l'action des différents agents anti-cancéreux est la mort des cellules tumorales par apoptose. Les voies de signalisation contrôlant l'apoptose sont donc largement dérégulées dans le mélanome comme dans d'autres types tumoraux. Le schéma décrit les mécanismes moléculaires de l'apoptose. Les protéines entourées de vert sont des protéines pro-apoptotiques. Les protéines entourées de bleu sont des protéines anti-apoptotiques. Les protéines étoilées en rose sont dérégulées dans le mélanome.

(Fecker et al. 2006) (figure 19). De plus de nombreuses voies de signalisations mutées dans le mélanome interviennent en faveur d'une diminution de l'apoptose. Ainsi BRAF qui, comme vu précédemment est très fréquemment sur-activé dans le mélanome, interagit directement avec la famille BCL-2 et conduit ainsi à une survie augmentée. De même ERK inhibe les protéines pro-apoptotiques BIM et BAD, inhibiteurs de BCL-XL (figure 19). Le rôle d'AKT est un peu plus controversé car il peut favoriser des réponses pro ou anti-apoptotiques suivant les cas. AKT régule l'expression de BIM et de Fas-ligand et inactive plusieurs protéines pro-apoptotiques telles que BAD ou la caspase 9 (figure 19). AKT peut également activer I κ B qui active à son tour le facteur de transcription NF κ B permettant la transcription de BCL-XL. Enfin, même si les mutations de p53 sont relativement peu fréquentes dans le mélanome comparé à d'autres types de cancers, d'autres effecteurs de la voie de p53 sont déficients. Notamment Apaf-1 est fréquemment réprimé par méthylation dans les mélanomes métastatiques (figure 19) (Soengas et al. 2001 ; pour revue Campioni et al. 2005).

1.3 La voie de la mélanogenèse est un mécanisme de résistance spécifique au mélanome

1.3.1 La voie de la mélanogenèse permet la synthèse de la mélanine

La mélanine est toxique pour les cellules y compris pour les mélanocytes. Les pigments mélaniques sont donc produits dans un compartiment sub-cellulaire appelé mélanosome. Le développement des mélanosomes s'effectue suivant plusieurs étapes consécutives. Les stades I et II sont les stades précoces de ce développement et durant ces stades la synthèse de mélanine n'a pas encore débutée. Le stade I correspond à un état sphérique proche de celui des lysosomes contenant une matrice interne non différenciée. Le stade II décrit des mélanosomes plus allongés pourvus d'une matrice fibreuse. Le stade III est marqué par une synthèse active de la mélanine qui s'accumule le long de la matrice fibreuse. Finalement le stade IV correspond à des mélanosomes matures remplis en quasi-totalité de pigments mélaniques. Les mélanosomes sont ensuite exportés vers les kératinocytes. Cependant, si le trafic d'export cellulaire ne fonctionne pas correctement, les mélanosomes de stade IV dégénèrent et libèrent dans le cytoplasme des cellules leur contenu toxique (figure 20).

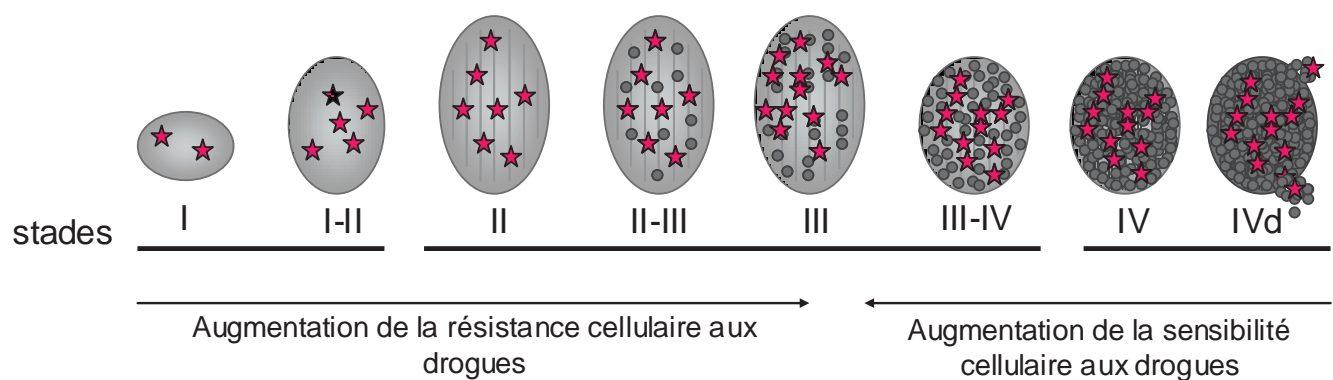


Figure 20: La voie de la mélanogénèse est associée à la chimiorésistance

La mélanogénèse et l'évolution des vésicules mélanosomales sont impliqués dans la résistance aux agents anti-tumoraux. Les mélanosomes captent les composés cytotoxiques dans les stades précoces de leur développement. Les stades tardifs sont plus favorables à l'action des composés cytotoxiques puisqu'en absence d'export de ces vésicules, les membranes se fragmentent en relâchant les composés toxiques dans le cytosol. Les différents stades de développement des mélanosomes et leur implication dans la chimiorésistance sont expliqués dans ce schéma adapté de Chen et al. 2009a.

1.3.2 La voie de la mélanogénèse est impliquée dans la chimiorésistance

Le mélanome possède des spécificités de résistance propres à la biologie des mélanocytes dont il est dérivé. Ainsi la voie de la mélanogénèse apparaît progressivement dans la littérature comme un mécanisme possible de résistance à la chimiothérapie. La première étude menée sur le sujet en 1998 a montré que des clones sélectionnés sur la base de leur résistance au CDDP présentaient une augmentation de l'expression de TYRP2, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'eumélanine, un des deux pigments de la mélanine avec la pheomélanine (Chu et al. 2000). Cette même étude avait identifié une corrélation entre le niveau d'expression de la TYRP2 et la résistance au CDDP ainsi qu'à d'autres agents anti-cancéreux ciblant l'ADN à la fois sur un panel de lignées de mélanome et sur des clones sur-expressseurs. Il a également été montré que la mélanine est capable de se lier avec la daunorubicine et la doxorubicine entraînant une augmentation de la résistance (Svensson et al. 2003).

La résistance au CDDP a ensuite été montrée comme étant dé-corrélée de l'expression de TYRP1, de la tyrosinase ou du contenu en mélanine des cellules (Pak et al. 2000). Les études sur le CDDP se sont ensuite poursuivies et il a été mis en évidence que le CDDP est séquestré dans des organelles tels que les mélanosomes puisque des co-localisations avec HMB45, marqueur de mélanosomes précoces, ont été vues en immunofluorescence (Chen et al. 2006a). Ce mécanisme permettrait ainsi de réduire la quantité de CDDP parvenant au noyau. De plus, un traitement au CDDP entraîne une augmentation de la mélanogénèse avec une plus grande activité de la tyrosinase (Chen et al. 2006a). Sur des lignées de mélanome présentant des mutations affectant la voie de la mélanogénèse (mutations identifiées sur les molécules gp100/Pmel17, sur la dysbindine et la pallidine ou encore sur la tyrosinase), une augmentation de la sensibilité au CDDP avait également été notée (Xie et al. 2009). Cette observation a ensuite été étendue à la vinblastine et à l'etoposide. Une étude a également montré que l'augmentation de la résistance grâce aux mélanosomes était hautement dépendante du stade de maturation de ces derniers (figure 20) puisque les stades II et III seraient corrélés à une plus grande résistance alors que les stades IV et IV avancé seraient accompagnés d'une augmentation de la sensibilité (pour revue Chen et al. 2009b).

Ces différentes études ont donc amené récemment à la proposition d'un modèle (Chen et al. 2009b). Ce dernier postule que les stades II et III de la maturation des mélanosomes favoriseraient la résistance des cellules de mélanome car les composés cytotoxiques seraient captés par les mélanosomes. Aux stades tardifs (stade IV) on assisterait à un renversement

de situation avec une sensibilisation aux agents chimio-thérapeutiques car les mélanosomes subissent des lésions au niveau de leurs membranes re-larguant dans le cytoplasme la mélanine et les composés préalablement séquestrés entraînant une cytotoxicité cellulaire. Il est probable que les cellules cancéreuses soient particulièrement sensibles à ce phénomène. Cette hypothèse se fonde sur une sélection des cellules de mélanome possédant un mauvais fonctionnement de la voie de sécrétion des mélanosomes leur permettant de mieux résister dans les phases précoces de maturation des mélanosomes. La voie de la mélanogenèse serait donc à double tranchant pour les cellules cancéreuses qui verraient augmenter à la fois leur résistance dans un premier temps mais aussi leur sensibilité dans les stades tardifs de maturation des mélanosomes (figure 20).

2 LES TRANSPORTEURS ABC : UN ROLE ENCORE CONTROVERSE DANS LA RESISTANCE DU MELANOME

2.1 Les transporteurs ABC : généralités et fonctionnement

2.1.1 La famille des protéines ABC

Les cellules saines ou cancéreuses ont besoin pour leur fonctionnement d'interagir avec le milieu extérieur à travers la membrane lipidique pour l'apport en nutriments, l'élimination des déchets cellulaires ou encore pour d'autres fonctions de régulation et de signalisation cellulaire. Il est donc nécessaire pour la cellule de contrôler les échanges entre le milieu extérieur et l'espace intra-cellulaire. Ces échanges peuvent se faire soit en faisant appel au système de transport passif qui fonctionne selon le sens du gradient du potentiel électrochimique de diffusion et qui ne requiert aucun apport en énergie, soit par un système de transport actif médié par des molécules spécialisées telles que les protéines de type ABC. Ce transport actif permet le passage de constituants contre le gradient de concentration moyennant une dépense énergétique provenant de l'hydrolyse de l'ATP. Ce système de transport est de toute première importance puisque 15 à 30% des protéines de la membrane sont des protéines de transport et que 60% de l'énergie dépensée par la cellule est dévolue au transport (pour revue Sauna et al. 2007).

Les protéines ABC (pour ATP-binding cassette) constituent une des plus grandes familles de protéines avec plus de 2000 protéines ABC et domaines ATPase identifiés selon la base de données des transcrits (pour revue Dassa et al. 2001). Cette famille de transporteurs a tout d'abord été découverte chez les bactéries et a ensuite été étendue à tout le règne vivant avec l'identification de membres présents chez les bactéries, les eucaryotes inférieurs et les eucaryotes supérieurs allant des plantes jusqu'aux mammifères et à l'homme (pour revue Higgins 1992).

Il existe 56 gènes de transporteurs ABC répertoriés chez les vertébrés et répartis selon huit sous-familles, identifiées par des lettres de A à H, sur la base de l'analyse de leur homologie de séquence des domaines NBD (pour Nucleotide Binding Domain) et TMD (pour TransMembrane Domain), de la structure des gènes et de l'organisation structurale des différents domaines fonctionnels. Parmi ces 56 gènes, 52 sont décrits chez l'Homme avec 48

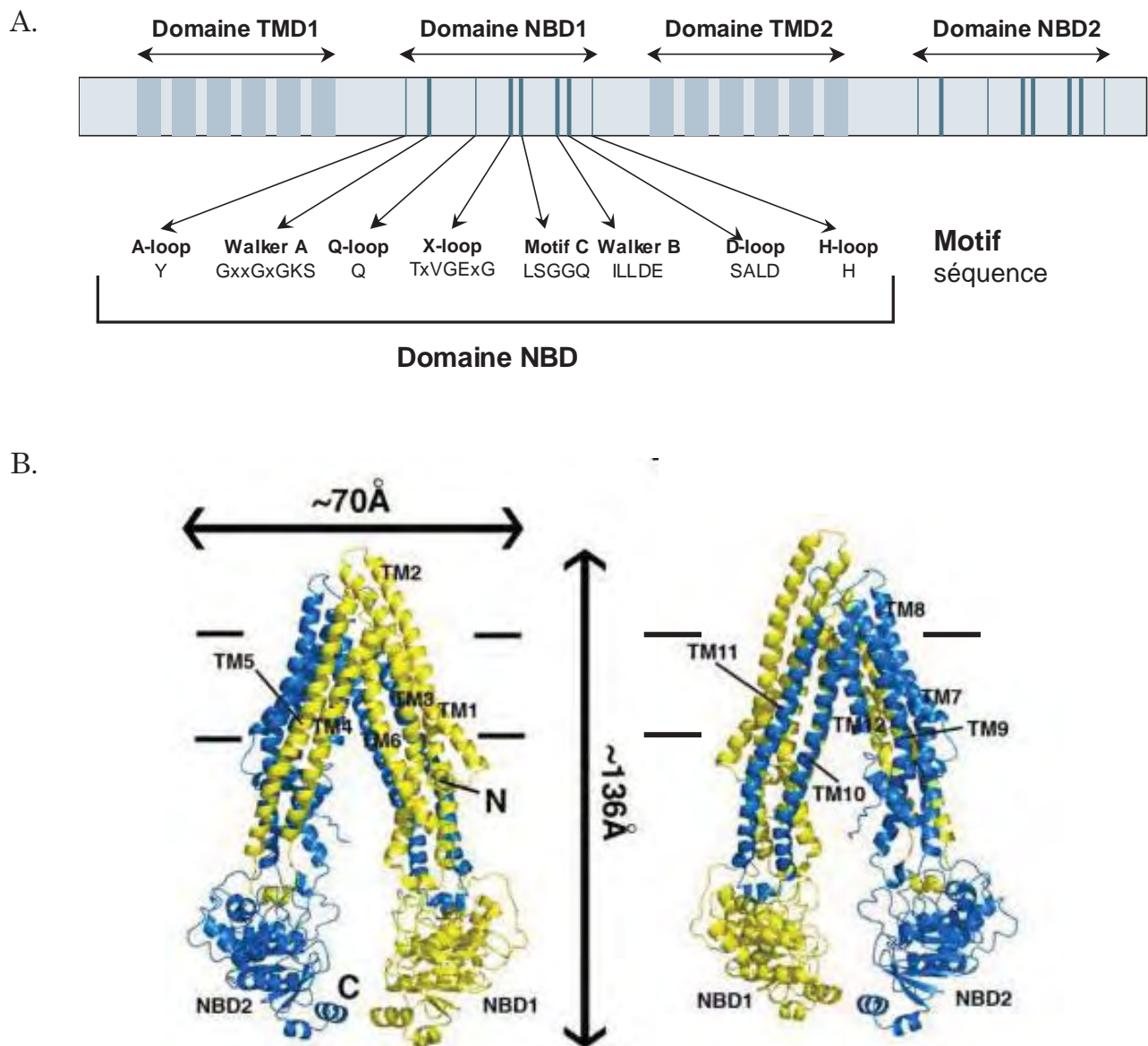


Figure 21 : Structure canonique des transporteurs ABC

A. Les transporteurs ABC possèdent une architecture commune composée de domaine transmembranaire (TMD) et de domaine de liaison à l'ATP (NBD). Au sein des domaines NBD, des motifs se distinguent tels que les Walker A et B ainsi que le motif C. Ce schéma est adapté de Ambudkar et al. 2003 et Sauna et al. 2007.

B. La structure 3D des différents motifs des domaines NBD du transporteur ABCB1 permet la formation de deux cavités pouvant accueillir les molécules d'ATP (Aller et al. 2009).

gènes fonctionnels, trois pseudogènes et un gène dont la séquence a été retirée des bases de données par le HUGO Gene Nomenclature Committee (pour revue Dean et al. 2005).

2.1.2 Modèle des structures secondaires et tertiaires des transporteurs ABC

De nombreuses études se sont intéressées aux structures secondaires et tertiaires et au mode de fonctionnement des transporteurs ABC. Dans un premier temps les modèles ont été élaborés à partir de protéines d'origine bactérienne et la structure cristallographique de HisP, une histidine perméase bactérienne fut la première décrite (Hung et al. 1998). Plus récemment la communauté scientifique s'est intéressée aux transporteurs humains et notamment à ABCB1. Malgré les difficultés à cristalliser ABCB1, des modèles d'ABCB1 humain ont été construits à partir de la résolution récente de la structure cristallographique d'ABCB1 (P-gp) murin (Aller et al. 2009 ; Protéine Data Bank référence 3G5U, 3G60 et 3G61) et celle du domaine NBD d'ABCB6 humain (Haffke et al. 2010) ; Protéine Data Bank référence 3NH6, 3NH9, 3NHA, 3NHB).

Les transporteurs ABC sont composés de façon canonique de deux domaines trans-membranaires (TMD) et de deux domaines de liaison à l'ATP (NBD) (figure 21A.).

Les domaines trans-membranaires hydrophobes sont généralement constitués de 6 hélices alpha mais leur nombre peut varier de 5 à 11. La constitution de ces hélices alpha est assez variable selon les transporteurs comparée à la très forte conservation de séquence des domaines NBDs et dans le cas d'ABCB1, c'est cette variabilité de séquence des hélices alpha qui détermine la spécificité vis-à-vis du substrat. Plusieurs études ont montré des interactions entre les domaines TMD5 et TMD8 ainsi qu'entre les domaines TMD2 et TMD11 (pour revue Hennessy et al. 2007). L'assemblage des hélices trans-membranaires délimiterait ainsi une poche pouvant accueillir le substrat. Un premier site dit de "faible affinité" serait proche de la surface externe de la cellule avec un diamètre de 50Å. Le deuxième site dit de "forte affinité" serait orienté vers le cytosol avec un diamètre plus petit de 9 à 25 Å (Aller et al. 2009 et pour revue Ambudkar et al. 2006).

Le domaine NBD est un domaine hydrophile généralement localisé dans le cytoplasme. Il porte la fonction ATPase fournissant l'énergie au transport et est constitué de plusieurs motifs caractéristiques. Il comprend tout d'abord deux motifs, communs à toutes les protéines ATPases, appelés respectivement Walker A (aussi dénommée P-loop) et Walker B, du nom de M. John Ernest Walker ayant découvert leur fonction, ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1997 (Walker et al. 1982). Ces deux premiers motifs possèdent des séquences très caractéristiques décrites dans la figure 21 A. Un troisième motif, le motif

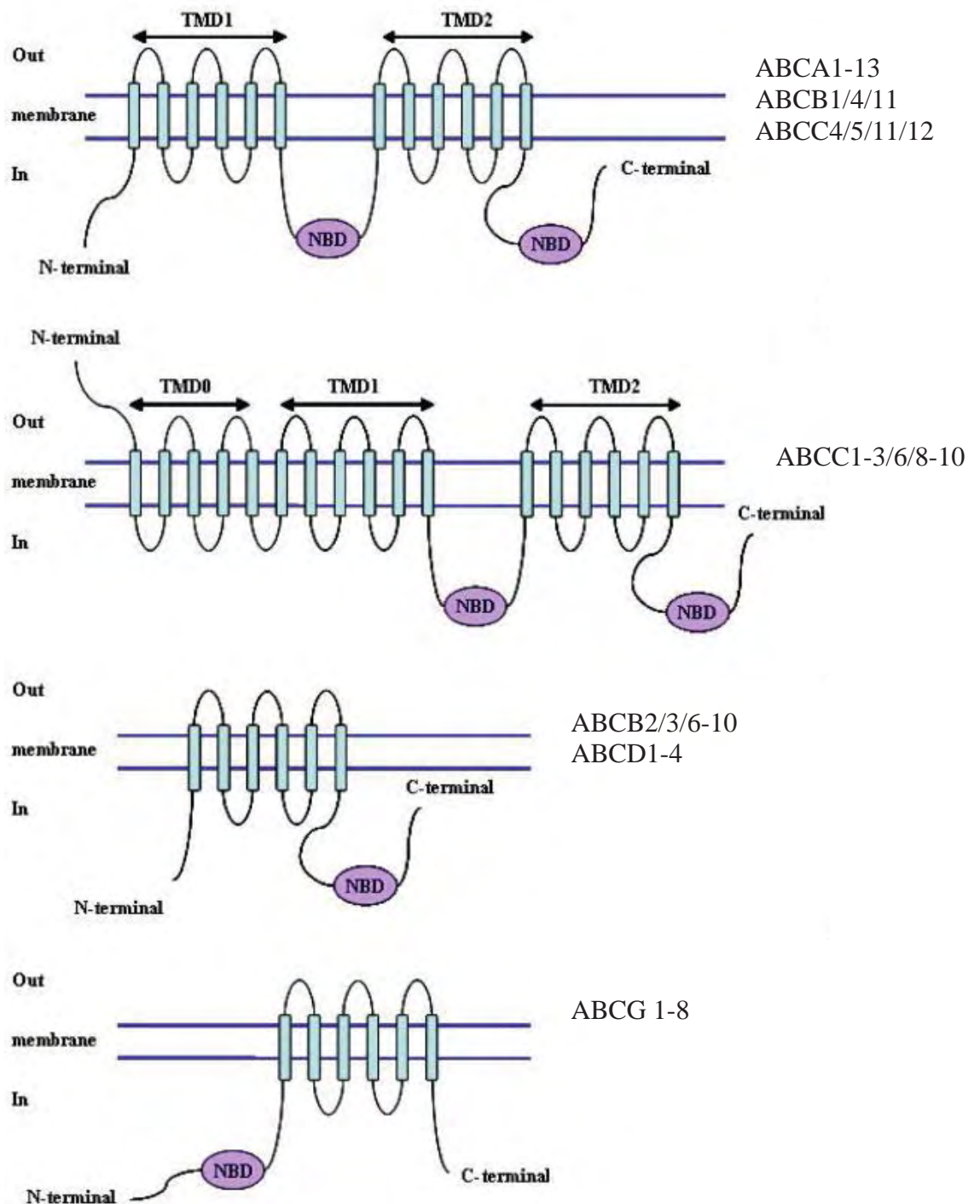


Figure 22 : Les différents modèles d'organisation des transporteurs ABC

Le détail de l'organisation des différents transporteurs ABC humains est décrit ci-dessus. Les familles ABCE et ABCF composée uniquement de deux domaines NBD ne sont pas représentées. Le transporteur ABCC7 (CFTR) comportant une structure canonique (premier schéma) avec un domaine régulateur placé entre les deux motifs, n'est également pas représenté. Ce schéma est tiré de Gillet et al. 2007.

LSGGQ aussi appelé signature des transporteurs ABC ou motif C, porte la spécificité des transporteurs ABC par rapport aux autres protéines ATPase. Ce dernier motif est situé entre les Walker A et B, séparé d'environ 20 acides aminés du Walker B. Il existe également d'autres motifs reconnaissables tels que la A-loop, composée d'un résidu aromatique placée 25 acides-aminés en amont du Walker A qui interagit avec le cycle adénine de l'ATP. La Q-loop et la H-loop ne sont composées que d'un acide aminé conservé correspondant respectivement à une glutamine et une histidine. Il a été démontré que les Walker A et B d'une des deux sous-unités NBD sont capables d'interagir avec la D-loop et le motif C de la deuxième sous-unité NBD. L'interaction des deux domaines NBD formerait ainsi deux sites d'interaction avec l'ATP (figure 21 B.) (pour revue Seeger et al. 2009 ; Ambudkar et al. 2006).

Cette organisation canonique n'est pourtant pas partagée par tous les transporteurs ABC (figure 22 ; annexe 2). Les familles ABCD et ABCG dont ABCG2 est l'exemple le plus connu sont ainsi organisées sous forme d'hémi-transporteurs pouvant s'assembler en homo ou hétéro-dimère pour reconstituer une structure canonique. La présence d'un domaine trans-membranaire supplémentaire est également observée comme c'est le cas pour certains membres des familles ABCA, ABCB et ABCC (pour revue Broccardo et al. 1999 et Albrecht et al. 2007). La sous-famille ABCA présente également une autre particularité puisque certains transporteurs de cette famille ne possèdent pas le motif C de signature des transporteurs ABC (pour revue Albrecht and Viturro 2007). Le cas de la structure du transporteur ABCC7 (ou CFTR pour Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) est également notable puisque ce transporteur dispose d'un domaine régulateur au niveau du cytosol entre le domaine NBD1 et TMD2. Enfin, il existe des transporteurs ABC ne possédant pas de domaine trans-membranaire avec notamment le cas des familles ABCE et ABCF.

Le transporteur ABCB5 est très proche des protéines ABCB1, 4 et 11 d'un point de vue phylogénétique. Cependant, le transcrit majoritaire de ce transporteur possède une organisation peu conventionnelle puisque qu'il possède un seul domaine TMD et deux domaines NBD dont un incomplet. La structure de ce transporteur est donc encore en débat et sera présentée dans la suite de l'étude.

2.1.3 Modèle de fonctionnement dynamique de la pompe

Pour pénétrer dans la cellule, le substrat doit d'abord être intégré au feuillet externe de la membrane plasmique puis être transféré au feuillet interne de cette même membrane avant d'être relargué dans le cytosol. Le modèle de fonctionnement de la pompe ABCB1 le plus utilisé est celui de la flippase. Dans ce modèle, le substrat est pris en charge par le

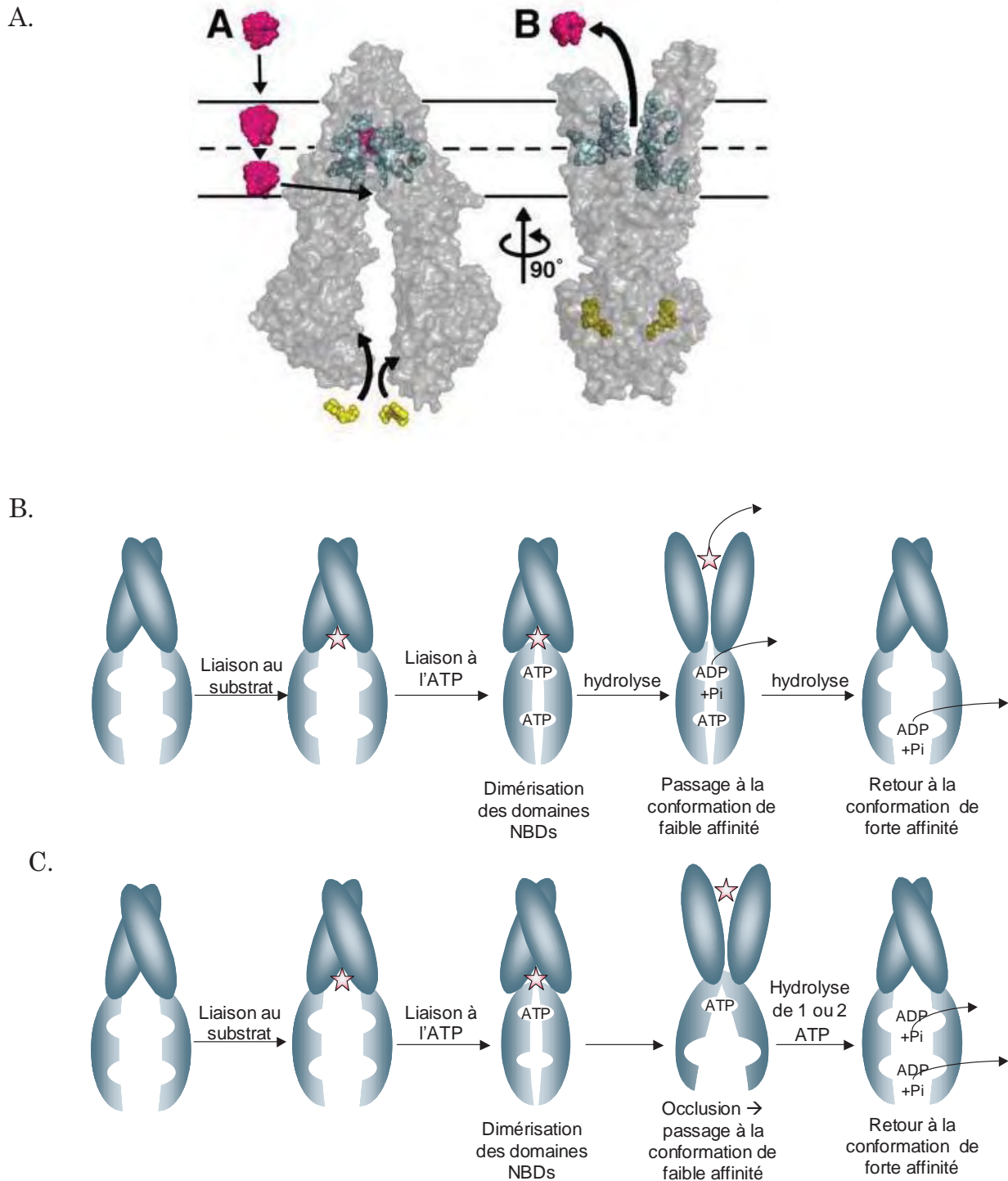


Figure 23 : Le modèle de fonctionnement du transporteur ABCB1

A. Le fonctionnement du transporteur ABCB1 est modélisé. Le substrat en rouge traverse la membrane plasmique par diffusion. En présence d'un transporteur ABC le substrat est pris en charge et est relargué dans le milieu extérieur suivant le modèle de la flippase. Les molécules d'ATP sont en jaune et la poche du substrat en bleu. Ce schéma est tiré de Aller et al. 2009.

B. Le premier modèle de fonctionnement de la pompe stipule que l'hydrolyse d'une première molécule d'ATP permet le passage du substrat du site de forte affinité au site de faible affinité et que le retour à la conformation initiale nécessite d'hydrolyse d'une deuxième ATP.

C. Le deuxième modèle propose que la liaison du substrat provoque à elle seule la dimérisation et le changement de conformation du site de forte affinité au site de faible affinité et la libération du substrat. L'hydrolyse d'une ou deux molécules d'ATP serait ensuite nécessaire pour retourner à la conformation initiale.

transporteur alors qu'il est dans le feuillet interne de la membrane plasmique et qu'il n'a pas encore été libéré dans le cytosol (ou une étape de ré-absorption dans ce feuillet est nécessaire). Le transporteur exporte alors la molécule substrat soit directement dans le milieu extérieur soit au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique (figure 23 A.) (Aller et al. 2009 et pour revue Hennessy and Spiers 2007). L'export du substrat par le transporteur nécessite plusieurs étapes (pour revues, Ambudkar et al. 2006 ; Callaghan et al. 2006 ; Hennessy and Spiers 2007 ; Seeger and van Veen 2009) :

- la fixation du substrat
- la fixation de l'ATP
- la dimérisation des domaines NBDs
- le changement de la conformation de forte affinité à la conformation de faible affinité des TMDs permettant le relargage du substrat
- le retour à la conformation initiale

Dans la conformation initiale, le transporteur présente au substrat un site dit de forte affinité et les domaines NBD ne sont pas sous forme de dimères. Le substrat est intégré au site de forte affinité du côté du cytosol proche du feuillet interne de la membrane plasmique via un passage formé par les domaines TMD2 et 11 d'un côté et/ou les domaines TMD5 et 8 de l'autre côté. La liaison du substrat permet ensuite un rapprochement du Walker A du premier domaine NBD avec le motif C du deuxième motif NBD et favorise ainsi la formation des dimères de NBDs. La présence du substrat permet également d'accélérer la liaison à l'ATP et il a été suggéré que le substrat entraîne une diminution de l'énergie d'activation de l'hydrolyse de ce dernier. Les molécules d'ATP interagissent en plusieurs points avec la poche formée par l'association des deux domaines NBDs. L'hydrolyse du γ -phosphate de l'ATP conduit à la formation d'une molécule d'ADP et d'un phosphate inorganique permettant la libération d'énergie. La communauté scientifique semble s'accorder sur le fait que l'export de substrat est concomitant à une dépense énergétique via l'hydrolyse d'une à deux molécules d'ATP. L'intervention de l'hydrolyse dans le processus d'export n'est pas encore très clair et deux modèles s'affrontent à ce sujet.

Le premier modèle, le plus empirique et communément admis, stipule que le changement de conformation du site de forte affinité en site de faible affinité entraînant le relargage du substrat est possible grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (pour revue Ambudkar et al. 2003). Le deuxième modèle qui semble plus corrélé aux données expérimentales, propose que le changement de conformation est la conséquence de la

dimérisation des domaines NBD et/ou à la liaison de l'ATP. En effet il a été observé que la seule présence de l'ATP entraîne un changement conformationnel important qui serait suffisant pour le passage du substrat du site de forte affinité au site de faible affinité (pour revue Seeger and van Veen 2009). Une théorie proche mais alternative de ce modèle envisage que la liaison à l'ATP implique la formation d'une structure non réversible appelé occlusion dans laquelle un seul des deux sites fixe une molécule d'ATP. La liaison d'un ATP aurait pour conséquence le rapprochement des deux NBDs au niveau du site où se trouve l'ATP tandis qu'au niveau du deuxième site vide les deux domaines NBDs s'éloignent. Ce serait cette structure en occlusion qui conduirait au passage du substrat du site de forte affinité au site de faible affinité (pour revue Sauna and Ambudkar 2007). Les deux modèles sont présentés dans la figure 23 B. et C.

Le passage du substrat du site de forte affinité au site de faible affinité s'accompagne de la diminution d'un facteur 10 de l'affinité du transporteur pour le substrat. Le substrat aurait alors une affinité assez faible pour être relargué de façon passive hors des domaines TMDs. Les différents modèles semblent s'accorder pour dire que l'hydrolyse d'un ATP est nécessaire pour que la pompe puisse retourner dans sa configuration initiale avant de recommencer un nouveau cycle d'export. Les domaines trans-membranaires reviendraient ainsi au site de forte affinité. Le dimère de NBDs, instable lorsqu'il est occupé par une molécule d'ADP, se dessassemblerait en libérant l'ADP.

2.1.4 Les protéines ABC ont des rôles physiologiques très diversifiés

La fonction la plus connue est la plus fréquemment associée aux transporteurs ABC est l'efflux de composés toxiques. Les trois transporteurs les plus connus pour cette fonction sont ABCB1, aussi appelé MDR1 pour Multi Drug Resistance 1 ou P-glycoprotéine (P-gp), ABCC1, aussi appelé MRP (pour Multidrug Resistance associated Protein) et ABCG2, aussi appelé BCRP (pour Breast Cancer Resistance Protein) ou MXR (pour Mithoxantrone Resistance Protein).

Le transport de lipides est une fonction fréquemment associée aux transporteurs ABC. Plusieurs membres de la sous-famille ABCB (ABCB2, ABCB3, ABCB8, ABCB9 et ABCB10) sont également impliqués dans le transport de peptides dans plusieurs compartiments sub-cellulaires. Une partie des protéines de la sous-famille ABCC comprenant les transporteurs ABCC4 (MRP4), ABCC5 (MRP5), ABCC11 (MRP8) et ABCC12 (MRP9) est impliquée dans le transport de nucléotides et d'analogues de nucléosides (pour revues Sampath et al. 2002 ;

Nom	Expression	Fonction	Référence
ABCA1	Ubiquitaire	Homéostasie du cholestérol	Joyce et al. 2003
ABCA2	Leukocytes, cerveau, reins, poumons, cœur	Homéostasie du cholestérol	Mack et al. 2007
ABCA3	Poumons	Sécrétion de surfactants pulmonaires	Ban et al. 2007
ABCA4	Rétine	Transport de composés retinoïdes	Beharry et al. 2004
ABCA5	Cerveau, poumon, cœur, glandes thyroïdales		Albrecht et al. 2007
ABCA6	Ubiquitaire	Transport lipidique des macrophages	Kaminski et al. 2001
ABCA7	Rate, thymus, moelle osseuse, leukocytes	Homéostasie du cholestérol	Iwamoto et al. 2006
ABCA8	Dans la plupart des organes		Albrecht and Viturro 2007
ABCA9	Cœur, cerveau	Transport lipidique des macrophages	
ABCA10	Cœur, cerveau, monocytes	Transport lipidique des macrophages	Wenzel et al. 2003
ABCA12	Peau, estomac	Transport lipidique des granules lamellaires	Jiang et al. 2009
ABCA13	Trachée, testicules, moelle osseuse		Albrecht and Viturro 2007
ABCB1	Nombreux tissus et barrières physiologiques	Transport de composés cationiques hydrophobes	
ABCB2	Nombreux tissus au niveau du RE	Transport de peptide pour le CMHI	Abele et al. 2004
ABCB3	Nombreux tissus au niveau du RE	Transport de peptide pour le CMHI	
ABCB4	Foie	Transport de phospholipides	Oude Elferink et al. 2007
ABCB5	Mélanocytes		
ABCB6	Mitochondrie	Métabolisme du fer dans les mitochondries	Krishnamurthy et al. 2006
ABCB7	Mitochondrie	Métabolisme du fer dans les mitochondries	Cavadini et al. 2007
ABCB8	Mitochondrie	Transport de peptides dans les mitochondries	Herget et al. 2007
ABCB9	Testicules, cerveau, moelle épinière, thyroïde	Transport de peptides dans les lysosomes	Zhang et al. 2000 Wolters et al. 2005
ABCB10	Mitochondrie	Transport de peptides dans les mitochondries	Herget and Tampe 2007
ABCB11	Foie	Transport de sels biliaires	Gerloff et al. 1998
ABCC1	Poumons, testicules, monocytes, leucocytes, macrophages	Transport de composés anioniques et de conjugués	Deeley et al. 2006
ABCC2	Foie, intestin, reins	Transport de composés anioniques et conjugués	
ABCC3	Poumons, intestins, foie, reins	Transport de composés anioniques et conjugués	
ABCC4	Nombreux tissus dont la prostate	Transport de nucléotides et analogues	Sampath et al. 2002
ABCC5	Ubiquitaire	Transport de nucléotides et analogues	Borst et al. 2007
ABCC6	Reins, foie	Transport de composés anioniques et conjugués	Finger et al. 2009 Li et al. 2009
ABCC7	Tissus exocriniens	Transport d'ion chlorure	Moran et al. 2008
ABCC8	Pancréas	Régulateur de canaux potassium	
ABCC9	Cœur, muscles	Régulateur de canaux potassium	Bryan et al. 2007
ABCC10	Faible dans tous les tissus sauf le pancréas	Transport de composés anioniques et conjugués	Kruh et al. 2007
ABCC11	Reins, Rate, colon, cerveaux	Transport de nucléotides et analogues	
ABCC12	Seins, testicules, cerveaux, ovaires, squelettes	Transport de nucléotides et analogues	
ABCD1	Peroxisomes	Transport lipidique	Wanders et al. 2007
ABCD2	Peroxisomes	Transport lipidique	
ABCD3	Peroxisomes	Transport lipidique	
ABCD4	Peroxisomes	Transport lipidique	
ABCE1	Ubiquitaire	Impliqué dans la traduction	Chen et al. 2006 Rodnina 2010
ABCF1	Ubiquitaire	Impliqué dans la traduction	Paytubi et al. 2009
ABCF2	Ubiquitaire	Impliqué dans la traduction	
ABCF3	Ubiquitaire	Impliqué dans la traduction	
ABCG1	Cerveau, rate, poumons, foie, macrophages	Transport de cholestérol et phospholipides	Velamakanni et al. 2007
ABCG2	Placenta, sein, intestin, foie, cellules souches	Transport d'anion, de cations et de conjugués	
ABCG4	Tissus du système nerveux	Transport de cholestérol et phospholipides	
ABCG5	Intestines, foie	Transport de stérols	
ABCG8	Intestines, foie	Transport de stérols	

Tableau 8 : Les fonctions physiologiques des transporteurs ABC humains

Les spécificités d'expression et les différentes fonctions physiologiques des 48 transporteurs sont données dans le tableau ci-dessus. Les fonctions données en gris correspondent à des hypothèses.

Borst et al. 2007 ; Kruh et al. 2007). Les membres restant des sous-familles ABCA, ABCB et ABCC pour ceux dont la fonction est connue ont été impliqués directement ou indirectement dans le transport de composés plus diversifiés. Parmi eux, on peut noter la présence d'ABCC7 (CFTR) connu pour son implication dans la pathologie de la mucoviscidose et son rôle de canal chlore.

Comme nous l'avons vu précédemment, les deux familles ABCE et ABCF sont dépourvues de domaine transmembranaire. Aucune fonction de transport ne leur est donc attribuée et ils sont actuellement associés à la traduction.

Le tableau 8 récapitule les fonctions associées, quand celles-ci sont connues, des différents transporteurs ABC humains (adapté de Gillet et al. 2007).

2.2 Les transporteurs ABC protègent les cellules saines de façon constitutive

Les transporteurs ABC sont capables d'effluer des substances toxiques provenant de notre environnement quotidien telles que des produits nocifs provenant de l'alimentation, de pesticides ou encore de fumée de cigarette. Les différentes protéines ABC transportant de tels composés sont stratégiquement placées au niveau de tissus particulièrement sensibles tels que les cellules souches adultes, le cerveau, l'utérus gravide, ou les testicules.

2.2.1 Les transporteurs ABC sont présents pour protéger les tissus sensibles de l'organisme

Les transporteurs ABC sont impliqués dans toutes les étapes du passage de composés xénobiotiques dans l'organisme.

Ils interviennent tout d'abord dans la distribution des substances exogènes ingérées en limitant l'absorption des composés xénobiotiques au niveau du tube gastrointestinal pour les composés assimilés par voie orale et au niveau des poumons pour les aérosols. Les transporteurs ABCB1 et ABCC2 sont présents dans les membranes apicales des cellules épithéliales et endothéliales du poumon tandis qu'ABCC1 est présent au niveau des membranes basolatérales (pour revue, van der Deen et al. 2005). Dans le tube gastro-intestinal, on retrouve une configuration similaire avec ABCB1, ABCC2 et ABCG2 au niveau

des membranes apicales et ABCC1 au niveau des membranes basolatérales (pour revue, Leslie et al. 2005).

Les transporteurs ABC régulent ensuite l'entrée des composés dans les cellules, tissus et compartiments pharmacologiques en étant présents au niveau des barrières biologiques pour protéger les tissus sensibles.

Le rôle d'ABCB1 a notamment été très étudié au niveau de la barrière hémato-encéphalique à travers le modèle de souris déficientes pour les deux gènes murins d'ABCB1 (*mdr1a* et *mdr1b*) et sur des chiens Border Collie (Mealey et al. 2001) puisque ces animaux sont beaucoup plus sensibles que les animaux sauvages à la neurotoxicité de nombreux composés dont l'ivermectine (un composé anti-parasitaire) (pour revue, Sarkadi et al. 2006).

Les souris déficientes pour ABCC1 et ABCB1 (*Mrp1* (-/-), *Mdr1a*(-/-)*1b*(-/-)) montrent un taux de xénobiotiques anormalement élevé dans le fluide cérébro-spinal et les souris déficientes pour le gène *Mdr1a* accumulent plus de substrat d'ABCB1 au niveau des tissus testiculaires par rapport aux souris sauvages, ce qui signifie que ces transporteurs sont exprimés dans les barrières sang-liquide cérébro-spinal et hémato-testiculaire (pour revue, Leslie et al. 2005).

La barrière placentaire exprime également des transporteurs ABC. La membrane apicale des syncytiotrophoblastes (cellules constituant la couche externe du placenta) est en contact direct avec le sang maternel et on y retrouve les transporteurs ABCB1, ABCC2, ABCC3 et ABCG2. La membrane basolatérale des syncytiotrophoblastes, en contact avec les cytotrophoblastes, le tissu stromal et le sang du fœtus, présente les transporteurs ABCC1 et ABCC5. De façon intéressante, l'expression de ces transporteurs n'est pas constante et diminue au cours du développement du fœtus (pour revue, Ni et al. 2011).

Enfin, ils favorisent l'élimination des composés nocifs. On les retrouve ainsi dans les organes d'élimination tels que le foie ou les reins.

Il est bien établi que les reins ont un rôle prépondérant dans l'élimination des déchets métaboliques et des substances toxiques exogènes via les urines. ABCB1 et ABCC2 sont retrouvés au niveau des membranes apicales et permettent l'export de xénobiotiques du sang vers les urines. ABCC1 quant à lui est présent pour protéger les tissus rénaux comme en attestent les souris *Mrp1*(-/-) développant des dommages rénaux après traitement à des agents anticancéreux (pour revue, Leslie et al. 2005).

Le foie est le site majeur de métabolisation des xénobiotiques. Ainsi le foie exprime de très nombreux transporteurs dont des transporteurs ABC pour éliminer les drogues et

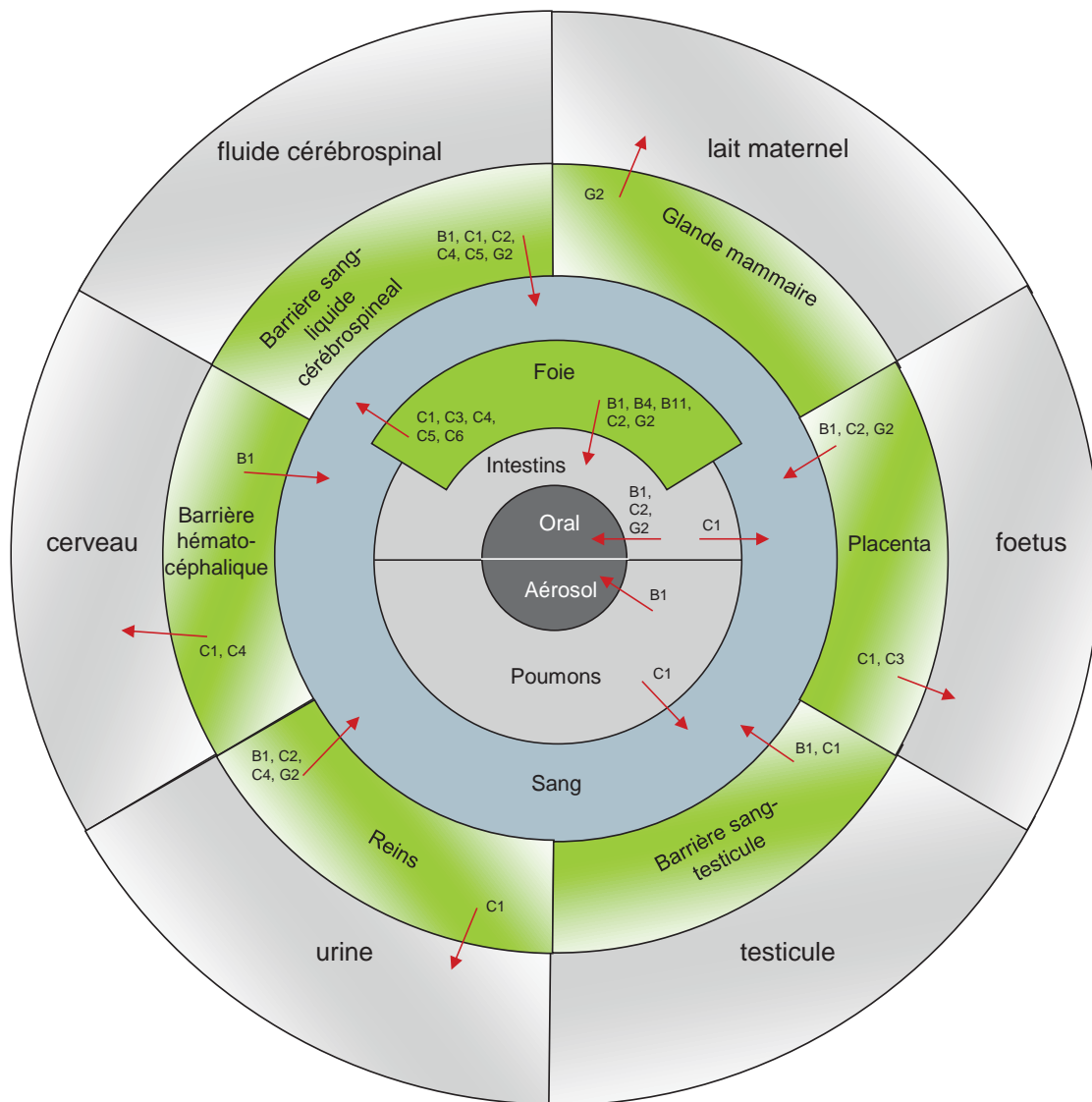


Figure 24 : Les transporteurs ABC sont localisés au niveau des barrières physiologiques de l'organisme

Les transporteurs ABC impliqués dans l'efflux de substances xénobiotiques sont répartis au niveau des différents organes « barrières » de l'organisme pour protéger les compartiments sensibles tels que le cerveau, le fœtus, les testicules ou le lait maternel. Ce schéma est adapté de Szakacs et al. 2006.

toxines (ainsi que leurs métabolites) vers la bile ou la circulation sanguine. Les transporteurs ABCB1, ABCC2 et ABCG2 sont présents au niveau de la membrane apicale et permettent le passage des substances nocives vers la bile qui est ensuite évacuée. Les transporteurs ABCC1, ABCC3, ABCC4, ABCC5 et ABCC6 sont présents au niveau de la membrane basolatérale et permettent un passage vers le système sanguin. Le niveau d'ABCC1 est relativement faible au niveau basal mais augmente considérablement durant la régénération hépatique chez la souris (pour revue, Chandra et al. 2004).

Le schéma figure 24 résume le positionnement des transporteurs ABC participant à la pharmacocinétique.

2.2.2 Les transporteurs ABC protègent l'organisme d'une grande variété de nocifs environnementaux

Les souris déficientes pour certains gènes de transporteurs ABC comme ABCB1 (*Mdr1a(-/-)1b(-/-)*), ABCC1 (*Mrp1(-/-)*) et ABCG2 (*Bcrp1/Abcg2(-/-)*) sont de façon surprenante, viables et fertiles mais présentent cependant des hypersensibilités à de nombreux composés. Ainsi, les transporteurs ABC participeraient à l'élimination de nombreux composés toxiques présents dans l'alimentation tels que le PhIP (2-amino-1-méthyl-6-phényl-imidazo[4,5-b]pyridine, un puissant carcinogène que l'on retrouve sur la viande cuite ou frite), les bioflavonoïdes (polyphénols issus des plantes donnant saveur et couleur aux fruits et légumes) ou le tabac. Ils sont également impliqués dans la défense contre les pesticides tels que l'ivermectine (composé antiparasitaire), le chlopyriphos (insecticide organophosphoré) ou le metolachlore (herbicide) ou encore contre les composés inorganiques tels que l'arsenic, l'antimoine, le zinc ou le cuivre (pour revue, Leslie et al. 2005). Le tableau 9 résume l'implication des transporteurs ABC face à ces composés.

2.3 Les transporteurs ABC contribuent à la chimiorésistance

Plusieurs transporteurs ABC ont été décrits pour conférer aux cellules cancéreuses le phénotype MDR (pour Multi Drug Résistance). Au moins douze transporteurs ont été impliqués dans le phénomène de résistance soit parce qu'ils ont été trouvés sur-exprimés dans des lignées cancéreuses sélectionnées pour leur résistance (ABCA2, ABCB1, ABCB4, ABCC1, ABCC2, ABCC4 et ABCG2) soit parce que des études de transfection ont montré que leur expression conférait une résistance (ABCB11, ABCC3, ABCC5, ABCC6, ABCC10 et

Origine	Xénobiotiques	Transporteurs
Composés toxiques issus de l'alimentation	PhIP	ABCC2, ABCG2
	Bioflavonoïdes	ABCG2
	Aflatoxine B1 (AFB1)	ABCC1
Tabac	NNK	ABCC1, ABCC2
	NNAL	ABCC1, ABCC2
Pesticides	Ivermectine	ABCB1
	Chlopyriphos	ABCB1
	Metolachlore	ABCC1
	Methoxychlor	ABCC1
	Fenitrothion	ABCC1
	Chlorpropham	ABCC1
Composés inorganiques	Arsenic	ABCB1, ABCC1
	Antimpine	ABCC1
	Zinc	ABCC2
	Cuivre	ABCC2
	Cadmium	ABCC2
	Manganèse	ABCC2

Tableau 9 : Les transporteurs ABC sont capables d'effluer les substances toxiques de l'environnement

La liste des composés xénobiotiques environnementaux connus pour être efflués par les transporteurs ABC est donnée dans le tableau ci-dessus. Ce tableau est adapté de Leslie et al. 2005.

ABCC11). Un rôle dans la chimiorésistance a également été suggéré pour les transporteurs ABCA3, ABCB5, ABCC12 et ABCF2. Chaque transporteur possède des spécificités de substrats qui sont décrites dans le tableau 10.

Dans le cas du mélanome, la présence de ces différents transporteurs est étudiée depuis longtemps mais la littérature ne semble pas s'accorder sur leur implication comme éléments majeurs dans le phénotype très chimiorésistant de ce cancer.

2.3.1 Les transporteurs de la famille ABCB

ABCB1 est le premier transporteur ABC qui fut isolé et cloné chez l'Homme pour sa capacité à conférer le phénotype MDR (Multi Drug Resistance) initialement à partir d'une lignée de cellules CHO résistantes à la colchicine (Juliano et al. 1976 ; Shen et al. 1986b ; Cornwell et al. 1987). Il a depuis été retrouvé dans de nombreuses autres lignées résistantes. Ce transporteur est le plus étudié et le mieux caractérisé. Il est naturellement sur-exprimé dans les cancers du côlon, du rein, du foie et dans les carcinomes adrénocorticaux ou hépatocellulaires (pour revue Huang et al. 2006 ; Lage 2008). Dans d'autres types tumoraux, son expression est initialement faible mais augmente après la chimiothérapie et en fonction de la dissémination métastatique. Il est ainsi positivement corrélé à un mauvais pronostic dans le cas des leucémies myéloïdes aiguës (AML), de myélomes multiples, de différentes tumeurs de l'enfant et dans certains cancers du sein (pour revue Lage 2008). Au niveau cellulaire, des études de sur-expression ont montré que la présence d'ABCB1 permettait de réduire l'accumulation de drogues. Il protège différents compartiments cellulaires et a ainsi été retrouvé au niveau de la membrane plasmique où il empêche l'entrée des substances toxiques dans la cellule mais aussi au niveau nucléaire où il protège le noyau et au niveau vésiculaire où il séquestre les drogues les empêchant ainsi d'interagir avec leur cible.

Etant le transporteur de référence, ABCB1 a rapidement été étudié dans le mélanome. Des études menées sur des panels de lignées de mélanome ont tout d'abord montré qu'ABCB1 n'est que faiblement présent (Berger et al. 1994 ; Schadendorf et al. 1995a). De nombreuses études sur des échantillons cliniques ont également été réalisées et confirment qu'ABCB1 est peu ou pas exprimé dans le mélanome. De plus, la grande majorité des études n'a pas trouvé de corrélation entre l'expression d'ABCB1 et l'historique de traitement des patients (Fuchs et al. 1991 ; Levine et al. 1993 ; Schadendorf et al. 1995b ; Ichihashi et al. 2001). Cependant des études récentes viennent nuancer l'ensemble de ces données avec des anticorps différents de ceux utilisés dans les études précédentes. Dans la première étude, menée sur 92 échantillons cliniques, une différence significative de l'expression d'ABCB1 entre les tumeurs primaires et les tumeurs métastatiques, représentant respectivement 50% et 73,8% avait été trouvée. De

Famille	Nom	Substrats
ABCA	ABCA2	Estramustine, mitoxantrone
	ABCA3	Doxorubicine, mitoxantrone, étoposide, vincristine
ABCB	ABCB1	<i>Anthracyclines</i> : daunorubicine, doxorubicine, epirubicine <i>Taxanes</i> : paclitaxel <i>Vinca alkaloïdes</i> : vinblastine, vincristine, vindesine <i>Epipodo-phyllotoxines</i> : etoposide, teniposide <i>Camptothecines</i> : irinotecan, topotecan, SN-38 <i>Inhibiteurs de kinases</i> : imatinib <i>Antibiotiques</i> : actinomycine D, dactinomycine, miotmycine C <i>Autres</i> : bisantrene, colichicine, valinomycine, puromycine, emetine, digoxin, methotrexate, mitoxantrone, saquinivir
	ABCB4	Daunorubicine, doxorubicine , vincristine, étoposide, mitoxantrone
	ABCB11	Paclitaxel
ABCC	ABCC1	<i>Anthracyclines</i> : daunorubicine, doxorubicine, epirubicine <i>Vinca alkaloïdes</i> : vinblastine, vincristine <i>Epipodo-phyllotoxines</i> : etoposide <i>Camptothecines</i> : irinotecan, SN-38 <i>Inhibiteurs de kinases</i> : imatinib <i>Autres</i> : colichicine, methotrexate, mitoxantrone, saquinivir
	ABCC2	<i>Anthracyclines</i> : doxorubicine, epirubicine <i>Vinca alkaloïdes</i> : vinblastine, vincristine <i>Taxanes</i> : paclitaxel, docetaxel <i>Epipodo-phyllotoxines</i> : etoposide <i>Camptothecines</i> : irinotecan, topotecan, SN-38 <i>Autres</i> : cisplatine, methotrexate, mitoxantrone, saquinivir
	ABCC3	<i>Vinca alkaloïdes</i> : vinblastine, vincristine <i>Epipodo-phyllotoxines</i> : etoposide, teniposide Methotrexate
	ABCC4	<i>Camptothecines</i> : irinotecan, topotecan, SN-38 <i>Thiopurines</i> : 6-mercaptopurine, 6-thioguanine <i>Autres</i> : Methotrexate, PMEA, AZT
	ABCC5	<i>Thiopurines</i> : 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, 5-fluorouracil <i>Autres</i> : Cisplatine, methotrexate, PMEA, AZT
	ABCC6	<i>Anthracyclines</i> : daunorubicine, doxorubicine <i>Epipodo-phyllotoxines</i> : etoposide, teniposide Cisplatine
	ABCC10	<i>Vinca alkaloïdes</i> : vinblastine, vincristine <i>Taxanes</i> : paclitaxel, docetaxel
	ABCC11	<i>Thiopurines</i> : 6-mercaptopurine, 5- fluorouracil PMEA
ABCG	ABCG2	<i>Anthracyclines</i> : daunorubicine, doxorubicine, epirubicine <i>Epipodo-phyllotoxines</i> : etoposide, teniposide <i>Inhibiteurs de kinases</i> : imatinib, Flavopiridol <i>Camptothecines</i> : irinotecan, topotecan, SN-38 <i>Autres</i> : methotrexate, mitoxantrone, AZT

Tableau 10 : Les substrats des transporteurs ABC impliqués dans la chimiorésistance des cancers

La liste des substrats connus pour les différents transporteurs ABC est donnée dans le tableau ci-dessus. Ce tableau est tiré de Szakacs et al. 2006.

plus une co-expression avec ABCC1 avait été détectée dans 44% des échantillons (tumeurs primaires et métastatiques confondues) (Walsh et al. 2010). Une étude *in vitro* a également montré une augmentation de l'expression d'ABCB1 ainsi qu'une mobilisation à la membrane plasmique en réponse à un traitement à la doxorubicine associée à une fonction d'efflux sur une lignée de mélanome (Molinari et al. 2000). Malgré ces dernière études, une nette tendance semble tout de même s'établir pour dire qu'ABCB1 n'est que peu exprimé dans le mélanome et que son rôle dans la chimiorésistance du mélanome s'il existe est mineur.

Parmi les autres membres de la famille ABCB, le transporteur **ABCB4** (MDR3) a été identifié dans des lignées résistantes à la daunorubicine, à la doxorubicine, à la vincristine, à l'etoposide ou au mitoxantrone. Des études de transfection ont également confirmé qu'il confère une résistance à la daunorubicine. Enfin, des études cliniques ont montré que son expression est inversement corrélée à la survie des patients. La transfection de cellules issues d'un cancer des ovaires par un vecteur de sur-expression d'**ABCB11** confère aux cellules une résistance au paclitaxel (pour revue, Gillet et al. 2007).

Dans le cas du mélanome, une étude portant sur **ABCB8** a montré que la sous-expression de ce transporteur par shRNA dans trois lignées de mélanome conduit à une augmentation de la sensibilité à la doxorubicine mais pas au taxol, 5-fluorouracil ou encore au cisplatine (Elliott et al. 2009). **ABCB5** est un transporteur encore relativement peu étudié mais qui commence à prendre une importance toute particulière dans le contexte du mélanome. Le rôle d'ABCB5 dans la résistance et l'agressivité du mélanome métastatique sera examiné en détail dans la suite de l'étude bibliographique.

2.3.2 Les transporteurs de la famille ABCC

La protéine **ABCC1** fut la deuxième protéine ABC humaine à avoir été isolée en 1992 à partir d'une lignée résistante de cancer du poumon (Cole et al. 1992). Sa sur-expression entraîne une résistance à divers composés et son spectre d'action se chevauche avec celui d'ABCB1. ABCB1 est capable de transporter des substances hydrophobes non modifiées et chargées positivement ou neutres. ABCC1 quand à lui peut transporter des composés chargés négativement ou neutres ainsi que des produits métabolisés conjugués (produits métaboliques de phase II conjugués au glutathion ou glucuronate) (pour revue Gillet et al. 2007). Il est fortement exprimé dans les leucémies, les carcinomes de l'oesophage et les cancers du poumon à petites cellules. Suivant les études, il a été ou non corrélé à la survie des patients et son implication clinique dans le phénomène de résistance est donc encore en discussion (pour revue Munoz et al. 2007 ; Lage 2008).

Le niveau d'expression d'ABCC1 dans le mélanome semble plus important que celui observé pour ABCB1. En effet une seule étude révèle une expression faible voire inexistante (Nooter et al. 1995) alors que plusieurs autres montrent des niveaux d'expression assez importants (Schadendorf et al. 1995b ; Berger et al. 1997 ; Ichihashi and Kitajima 2001 ; Walsh et al. 2010). Quelques travaux montrent de plus une corrélation avec la progression de la maladie (Schadendorf et al. 1995b ; Walsh et al. 2010). Cependant, la corrélation de l'expression d'ABCC1 avec l'historique de traitement des patients ne fait pas l'unanimité. En effet, dans une première étude, aucune différence n'avait été visualisée entre les patients ayant subi un traitement par rapport à ceux n'ayant pas subi de traitement (Schadendorf et al. 1995b). Une autre étude vient contredire cette dernière après analyse d'échantillons cliniques avant et après traitement. Après chimiothérapie, six des huit patients expriment plus d'ABCC1 même si cette différence n'est pas statistiquement significative (Ichihashi and Kitajima 2001). Des études *in vitro* viennent appuyer ce résultat avec une expression d'ABCC1 corrélée à la chimiorésistance dans un large panel de 35 lignées de mélanomes associée à des expériences d'efflux de la calcéine ou de daunomycine radio-marquée (Berger et al. 1997). Une étude shRNA conduite sur trois lignées de mélanome avait également montré un effet sensibilisateur de l'inhibition d'ABCC1 sur des traitements à la doxorubicine (Elliott and Al-Hajj 2009). Le rôle d'ABCC1 dans la chimiorésistance du mélanome est donc relativement bien étayé dans la littérature malgré quelques études discordantes.

Le transporteur **ABCC2** a également été souvent impliqué dans la chimiorésistance. La présence d'ABCC2 est décrite dans les cancers rénaux, gastro-intestinaux, colorectaux et hépatocellulaires. Les cellules sélectionnées pour leur résistance au cisplatine ou à la 9-nitro-camptothécine expriment plus fortement ABCC2 et l'absence d'expression d'ABCC2 a été corrélée positivement à la survie des patients pour certains cancers (pour revue Szakacs et al. 2006).

Dans le cas du mélanome, il existe peu d'études s'intéressant à ce transporteur mais des données fonctionnelles sont disponibles et permettent d'envisager un rôle non négligeable dans la chimiorésistance de ce cancer. Une lignée de mélanome sélectionnée pour sa résistance au cisplatine par une exposition prolongée à la substance a notamment montré une sur-expression d'ABCG2 au niveau ARNm et protéine par rapport à la lignée de base. Aucun autre transporteur n'avait été trouvé sur-exprimé de la sorte dans cette étude (parmi les transporteurs étudiés à savoir ABCB1, ABCC1 et ABCG2) (Liedert et al. 2003). Une autre étude *in vitro* montrait qu'une sous-expression d'ABCC2 par shRNA dans trois lignées

différentes de mélanomes conduisait à une sensibilisation à la doxorubicine (Elliott and Al-Hajj 2009).

ABCC3 a moins d'affinité pour les agents anti-cancéreux et transporte donc moins de substrats qu'**ABCC1** ou **ABCC2**. Il confère cependant un niveau de résistance non négligeable à certaines substances (pour revue Gillet et al. 2007 ; Lage 2008). Il a été retrouvé dans certains types cancéreux tels que les cancers de l'ovaire, du sein, du pancréas, des carcinomes et des gliomes mais n'a pas été corrélé à la survie des patients. **ABCC4**, **ABCC5** et **ABCC11** transportent des analogues de nucléotides tels que le 6-mercaptopurine, le 6-thioguanine, le PME_A (9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine), ou le azidothymidine monophosphate et pourraient donc participer à la résistance face à ces composés (pour revue Szakacs et al. 2006 ; Gillet et al. 2007). L'amplification d'**ABCC6** a été retrouvée dans des cellules de leucémie sélectionnées pour leur résistance à l'antracycline. Il est également capable d'induire un niveau faible de résistance à l'étoposide, la doxorubicine, la daunorubicine et au cisplatine (pour revue Gillet et al. 2007). Son rôle clinique semble tout de même limité. La sur-expression d'**ABCC10** entraîne une forte résistance au docetaxel et un niveau plus faible de résistance a également été retrouvé avec le paclitaxel, la vincristine et la vinblastine. Dans les cancers de la face et du cou, il a été corrélé au caractère réfractaire à la chimiothérapie suggérant un rôle en clinique (pour revue Gillet et al. 2007).

Cependant aucune donnée n'est aujourd'hui disponible sur l'expression de ces transporteurs dans le mélanome.

Nous avons vu que certains transporteurs de la famille ABCC tels que **ABCC1** et **ABCC2** sont capables de co-transporter des substances conjuguées au glutathion. La conjugaison entre des molécules électrophiles telles que certains anti-cancéreux et le glutathion est catalysée par une famille d'enzymes appelées GST (pour Glutathione S-Transférases). La simple action de conjugaison au glutathion a pour conséquence une perte de réactivité des agents électrophiles et donc une cytotoxicité moindre. Il a d'ailleurs été établi que certains membres de la famille des GST étaient sur-exprimés dans les cancers. Cependant il a également été montré dans d'autres types tumoraux que la présence des pompes **ABCC1** et **ABCC2** était nécessaire pour potentialiser la protection contre les anti-cancéreux par les GST. Dans le cas du mélanome, cette association a également été étudiée. Ainsi il a été montré très tôt que la GST π était plus exprimée dans des lignées de mélanomes sélectionnées pour leur résistance à différentes substances telles que le BCNU, le cisplatine ou le melphalan par exposition prolongée de la lignée de base (G-3361) à ces substances

(Wang et al. 1989). Un peu plus récemment, une équipe s'est penchée sur l'effet combiné des protéines GST et ABCC1, montrant sur la lignée de mélanome CAL-1 que la sur-expression ectopique de la GST π 1 augmentait la résistance à la vincristine et au chlorambucil et que l'inhibition d'ABCC1 par la sulfinpyrazone ou le verapamil permettait également de renverser complètement cette résistance (Depeille et al. 2004). La même équipe a ensuite montré sur la lignée de mélanome A-375 que l'inhibition de la GST π 1 par des shRNA ou des inhibiteurs pharmacologiques (curcumin ou acide éthacrynique) avait un effet sensibilisateur à l'étoposide. De plus l'action des siRNA GST π 1 combinée à celle d'inhibiteurs de ABCC1 (sulfinpyrazone et MK571) entraînait également une augmentation significative de la sensibilité à l'étoposide (Depeille et al. 2005).

2.3.3 ABCG2

ABCG2 fut le troisième gène ABC humain isolé en 1998 pour son implication dans la résistance aux agents anticancéreux dans une lignée de cancer du sein, il fut d'ailleurs tout d'abord appelé BCRP (pour Breast Cancer Resistance Protein) (Doyle et al. 1998 ; Allikmets et al. 1998 ; Miyake et al. 1999). Il fut particulièrement étudié pour le transport du mitoxantrone qui reste un substrat de faible affinité pour ABCB1 et ABCC1. Son implication en clinique est encore controversée au vu des études divergentes principalement dans les leucémies aiguës myéloïdes mais aussi dans certaines tumeurs solides (pour revue Lage 2008).

Très peu d'études sont disponibles sur le rôle d'ABCG2 dans le mélanome mais celles-ci sont plutôt en défaveur d'une implication possible dans la chimiorésistance du mélanome métastatique. Une étude comparant des tissus de nævi bénins et de mélanomes a été menée et n'a pas montré de différence significative de l'expression des ARNm d'ABCG2 entre les différents échantillons. Au niveau protéique, aucune expression d'ABCG2 n'a été détectée sur 19 échantillons de nævi et 66 échantillons de mélanomes dont 50 provenant d'une tumeur primaire et 16 provenant de métastases cutanées ou sous-cutanées (Deichmann et al. 2005). De plus, *in vitro* aucun effet de la sous-expression de ABCG2 par shRNA dans des lignées de mélanomes n'avait été visualisé sur la sensibilité à la doxorubicine (Elliott and Al-Hajj 2009).

2.3.4 Les transporteurs de la famille ABCA

ABCA2 a été étudié pour sa propriété à conférer une résistance à l'estramustine. Une sur-expression d'ABCA2 a également été associée à une lignée résistante à la mitoxantrone dans laquelle ABCG2 n'était pas présent (pour revue Huang and Sadee 2006). Une étude a également montré que les traitements au méthotrexate, à la vinblastine ou à la doxorubicine

	Modulateurs	Transporteurs
Inhibiteur de première génération	Amiodarone	ABCB1
	Cyclosporine	ABCB1, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC10
	Quinidine	ABCB1, ABCC1
	Quinine	ABCB1, ABCC1
	Verapamil	ABCB1, ABCB11, ABCC1
	Nifedipine	ABCB1
	Dexniguldipine	ABCB1
Inhibiteur de seconde génération	PSC-833 (Valspodar)	ABCB1, ABCC2
	VX-710 (Biricodar)	ABCB1, ABCC1, ABCG2
Inhibiteur de troisième génération	GF120918 (Elacridar)	ABCB1, ABCG2
	LY475776	ABCB1, ABCC1
	LY335979 (Zosuquidar)	ABCB1
	V-104	ABCB1, ABCG2
	R101933 (Laniquidar)	ABCB1
	CBT-1	ABCB1
	MS209 (Dofequidar)	ABCB1, ABCC1
	ONT-093	ABCB1
	Mitotane	ABCB1
	Sulindac	ABCC1
	XR9576 (Tariquidar)	ABCB1, ABCC1
	S9788	ABCB1
Autres	Disulfiram	ABCB1, ABCC1
	FTC (Fumitremorgin C)	ABCG2
	MK571	ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC10
	Tricyclic isoxazoles	ABCC1
	Pluronic L61	ABCB1

Tableau 11 : Les inhibiteurs pharmacologiques des transporteurs ABC impliqués dans la chimiorésistance des cancers

Divers inhibiteurs d'ABCB1 et de quelques autres transporteurs ont été développés et améliorés au cours du temps. La liste des différents inhibiteurs pharmacologiques ainsi que leur spécificité d'action est donnée dans le tableau ci-dessus. Ce tableau est tiré de Szakacs et al. 2006 et Lee 2010.

entraînaient une augmentation de l'expression de ABCA2 et **ABCA3** (pour revue Gillet et al. 2007). Une sur-expression d'ABCA3 a également été associée à une plus grande résistance au mitoxantrone, à l'étoposide et à la vincristine. ABCA3 a été retrouvé dans des échantillons cliniques de patients atteints d'AML et a été associé à un mauvais pronostic (Chapuy et al. 2008).

Aucune donnée n'est aujourd'hui disponible pour discuter le rôle de ces transporteurs dans le cas du mélanome.

Les transporteurs ABC sont donc largement impliqués dans la chimiorésistance de nombreuses pathologies cancéreuse et dans ce cadre, des approches thérapeutiques ont été menées afin de contourner le phénotype MDR. Cependant, malgré la présence de certains éléments bibliographiques, leur rôle dans la chimiorésistance du mélanome reste encore à éclaircir.

2.4 Les transporteurs ABC : des cibles pharmacologiques ?

Etant donné l'implication des différents transporteurs ABC dans la chimiorésistance des cancers, des inhibiteurs pharmacologiques ont été développés pour modifier les paramètres pharmacocinétiques des agents anti-cancéreux en empêchant leur efflux par les transporteurs ABC dans une optique de combinaison thérapeutique.

Moins de 10 ans après la découverte d'ABCB1, des essais cliniques ont débuté pour tester des inhibiteurs pharmacologiques de ce transporteur. Les premiers essais cliniques ont permis d'éprouver des modulateurs dits de première génération tels que le verapamil, la cyclosporine et la quinine (tableau 11). De façon générale ces premiers modulateurs d'ABCB1 sont assez toxiques et n'ont pas réussi à apporter de bénéfices cliniques aux patients (tableau 12) (pour revue Szakacs et al. 2006). Ces échecs cliniques sont la conséquence de l'expression d'ABCB1 dans les tissus sains et de sa participation à la détoxification physiologique. Ainsi, l'index thérapeutique de ces inhibiteurs est faible.

Modulateurs	Agent anti-cancéreux	Phase clinique	Type de cancer	Conclusion
Cyclosporine	ADE	III	Leucémie aiguë myéloïde	Pas de bénéfice
	Daunorubicine, cytarabine	III	Leucémie aiguë myéloïde	Augmentation de la survie
	VAD	III	myélome	Pas de bénéfice
Quinidine	Epirubicin	III	Cancer du sein	Pas de bénéfice
Quinine	Mitoxantrone, cytarabine	III	Syndrome myélo-displasique	Augmentation de la survie pour les patients ABCB1 positifs
			Leucémie aigue	Pas de bénéfice
	Mitoxantrone, cytarabine, Idarubicine	III	Leucémie aiguë myéloïde	Augmentation des réponses complètes pour les patients ABCB1 positifs
Verapamil	Vindesine, Ifosfamide	III	Cancer du poumon non à petites cellules	Augmentation de la survie
	CAVE	III	Cancer du poumon à petites cellules	Pas de bénéfice
	VAD	III	myélome	Pas de bénéfice
	Vindesine, 5-FU	III	Cancer du sein	Augmentation de la survie et du taux de réponse
PSC-833 (Valspodar)	Daunorubicin, cytarabine, etoposide	III	Leucémie aiguë myéloïde	Pas de bénéfice ou essai clinique stoppé pour toxicités trop élevées
	Mitoxantrone, etoposide, cytarabine	III	Leucémie aigüe myéloïde	Pas de bénéfice
	Carboplatin, paclitaxel	III	Cancer de l'ovaire	Pas de bénéfice
			Cancer du poumon non à petites cellules	essai clinique stoppé pour toxicités trop élevées
VX710	paclitaxel	II	Tumeurs solides	Pas de conclusion
MS209 (Dofequidar)	Cyclophosphamide, doxorubicine, fluorouracil	III	Cancer du sein	Pas de bénéfice
CBT-1	Paclitaxel, carboplatin	III	Cancer du poumon non à petites cellules	Non publiée
Mitotane	Doxorubicine, cisplatine	II	Carcinome adrenocortical	Pas de conclusion
R101933	docetaxel	I	Tumeurs solides	Pas de bénéfice
LY335979	CHOP	I/II	Lymphoma non Hodgkinien	Pas de conclusion
XR9576	vinorelbine	I/II	Tumeurs métastatiques	Pas de conclusion
GF120918	topotecan	I	Tout type de cancer	Pas de bénéfice

Tableau 12 : Les essais cliniques entrepris avec des inhibiteurs pharmacologiques des transporteurs ABC

De nombreux essais cliniques ont été entrepris pour tester les différents inhibiteurs pharmacologiques des transporteurs ABC en les associant à des chimiothérapies classiques dans l'optique de contourner les résistances développées à l'encontre de ces dernières. La nature des modulateurs de transporteurs ABC ainsi que des agents de chimiothérapie, le type de pathologie cancéreuse et les conclusions tirées des différents essais cliniques sont donnés dans le tableau ci-dessus. Ce tableau est tiré de Szakacs et al. 2006 et Lee 2010.

Abréviations : ADE (Ara-c, Daunorubicine, Etoposide) ; VAD (Vincristine, Doxorubicin, Dexamthasone) ; CAVE (Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Etoposide) ; CHOP (Cyclophosphamide, Hydroxy-daunorubicine, Vincristine, Prednisone).

Ces premiers essais ont conduit au développement d'une seconde génération de modulateurs qui sont pour la plupart des dérivés des composés de première génération montrant une plus grande efficacité et des effets secondaires réduits. Ces modulateurs de seconde génération sont décrits dans le tableau 11. Le plus prometteur, le PSC833 (Valspodar) se montrait capable de reverser le phénotype MDR sur des lignées cellulaires et sur des modèles animaux. Cependant, les essais cliniques n'ont pas donné les résultats escomptés avec des problèmes de métabolisation et d'élimination des drogues entraînant une augmentation de la concentration de substances anti-cancéreuses dans le sérum. Les essais cliniques ont donc soit été arrêtés prématurément, soit n'ont pas montré de bénéfice pour les patients (tableau 12) (Wu et al. 2008).

Une troisième génération a donc été développée afin de contourner les limitations observées par le passé (tableau 11). Ces nouveaux agents modulateurs ne sont pour la plupart pas métabolisés de la même façon que les agents de deuxième génération et n'affectent ainsi pas la pharmacocinétique des substances anti-cancéreuses. Le Zosuquidar (LY335979) est l'un de ces composés de dernière génération et l'un des plus prometteurs. Les essais cliniques de phase I et II concernant le LY335979 sont plutôt encourageants sur le lymphome non Hodgkinien et une phase III est prévue. Le XR9576 a également démontré un fort potentiel durant les phases pré-cliniques et une phase I n'a pas révélé d'effet sur la pharmacocinétique du paclitaxel, de la vinorelbine ou de la doxorubicine. Cependant les essais de phase II et III ont dû être arrêtés prématurément à cause d'une trop grande toxicité des agents chimiothérapeutiques (Lee 2010).

En parallèle des essais cliniques entrepris pour les inhibiteurs d'ABCB1, l'importance de ce transporteur en clinique a pris un nouveau virage. En effet, la quantification de l'expression d'ABCB1 entre désormais dans les tests diagnostiques cliniques des leucémies aigües myéloïdes. Il est également aujourd'hui recommandé par la FDA et l'EMA (European Medicines Agency) pour le développement de nouveaux agents anti-cancéreux de connaître leur statut vis-à-vis d'ABCB1 (substrat ou non substrat) et les deux seuls agents anti-cancéreux ayant été approuvés par la FDA en 2010 sont le cadaxitaxel, un dérivé de taxol non pris en charge par ABCB1 (Tsao et al. 2011) et l'eribulin, un halichondrin non substrat d'ABCB1 (Swami et al. 2011).

Plusieurs voies de résistance du mélanome ont donc été identifiées à commencer par une altération de la sensibilité à l'apoptose ainsi qu'une résistance spécifique aux agents alkylants par des voies de réparation de l'ADN. La voie de la mélanogenèse, apparaît également comme déterminante même si des éléments sont encore manquants pour parfaire ce modèle. Enfin, les transporteurs de type ABC pourtant très impliqués dans la résistance d'autres types tumoraux n'ont pas encore été clairement reliés à la résistance du mélanome. Ces transporteurs, outre leur rôle direct dans la résistance, ont également été associés au phénotype de cellules souches cancéreuses que nous avons évoqué précédemment. Ce modèle illustrant le développement du mélanome pourrait également permettre d'expliquer la chimiorésistance et la récurrence métastatique.

LE MODELE DES CELLULES RESISTANTES INITIATRICES DE MELANOME (CRIM) : UN NOUVEAU CONCEPT POUR EXPLIQUER LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME

1 PRESENTATION DU MODELE DES CELLULES CRIM

La question de l'existence de cellules souches cancéreuses fut pour la première fois abordée en 1964 lorsque Kleinsmith and Pierce décrivirent dans un modèle de tératocarcinome, la présence de cellules très tumorigènes ayant un fort potentiel de différenciation (pour revue Clevers 2011). Les tumeurs circulantes et notamment la leucémie aiguë myéloïde furent ensuite les modèles de choix pour l'étude des cellules souches cancéreuses par analogie avec les voies de différenciation hématopoïétique bien connues des cellules saines. Au sein des leucémies aiguës myéloïdes, une sous-population CD34⁺ CD38⁻ fut identifiée comme la seule capable de former des tumeurs chez la souris immuno-déprimée (Uckun et al. 1995 ; Lapidot et al. 1994 ; Bonnet et al. 1997). Ce concept fut ensuite beaucoup plus récemment étendu aux tumeurs solides. Des travaux sur le cancer du sein furent notamment menés par Clarke et al. en 2003 (Al-Hajj et al. 2003). Des études sur les tumeurs cérébrales (Singh et al. 2003 ; Singh et al. 2004) et les cancers colorectaux suivirent (Ricci-Vitiani et al. 2007 ; O'Brien et al. 2007). Depuis peu, des travaux sur le mélanome apparaissent. Cependant malgré un nombre croissant d'études sur le sujet, le concept de cellules souches cancéreuses dans les tumeurs solides fait encore largement débat car les méthodes d'identification utilisées ne permettent pas de prouver les caractéristiques strictes de cellules souches pour les populations étudiées. Dans la suite de l'étude, ces populations seront dites « cellules initiatrices de tumeurs » et non « cellules souches cancéreuses ». Dans le cas du mélanome, nous avons choisi d'utiliser le terme de Cellule Résistantes Initiatrice de Mélanome (CRIM) d'une part pour s'éloigner du concept de cellules souches cancéreuses et d'autre part pour faire apparaître les deux caractéristiques principales de ces cellules à savoir leur capacité à induire des tumeurs *in vivo* et de résister aux agents anti-cancéreux.

1.1 Identification des cellules CRIM

La grande majorité des études traitant du concept des cellules souches cancéreuses suivent un seul et même scénario : l'identification et l'isolement *in vitro* d'une sous-population cellulaire au sein d'une tumeur hétérogène et la démonstration d'un différentiel de prise tumorale dans des modèles de xénogreffes en série chez la souris immuno-déprimée.

1.1.1 Identification de cellules CRIM à partir de marqueurs membranaires

La technique la plus largement utilisée pour isoler ces sous-populations tumorigènes est leur tri sur la base de marqueurs cellulaires identifiés comme marqueurs de cellules souches adultes ou embryonnaires. Les cellules exprimant ces marqueurs sont triées par cytométrie en flux ou colonnes magnétiques. Une fois isolées, ces cellules sont étudiées pour leurs capacités tumorigènes, de différenciation et d'auto-renouvellement. On peut distinguer deux catégories de marqueurs de cellules CRIM :

- les marqueurs issus de l'étude de cellules initiatrices de tumeurs dans d'autres types tumoraux relevant généralement de la voie de différenciation des cellules souches hématopoïétiques.
- Les marqueurs issus de l'étude des voies de différenciation propres aux mélanocytes dont dérivent les mélanomes.

Parmi les marqueurs de la première catégorie, on trouve notamment CD133 (prominin-1), une protéine au rôle inconnu qui interviendrait dans des micro-domaines lipidiques de la membrane plasmique ; CD20 (B lymphocyte antigen), une phosphoprotéine glycosylée présente à la surface de tous les lymphocytes B matures ; et certains transporteurs ABC tels que ABCB1 et ABCG2.

Le marqueur **CD133** avait déjà été identifié dans le cas des glioblastomes. Dans le cas du mélanome, cette protéine a été corrélée à la progression de la maladie puisque son expression est plus importante dans des échantillons de mélanomes que dans les naevi bénins chez des patients (Klein et al. 2007). Son expression dans des échantillons de patients est également retrouvée sur une sous-population représentant moins de 1% de la population tumorale. De plus les cellules CD133⁺ sont plus tumorigènes dans un modèle de souris NOD/SCID (Monzani et al. 2007). Des clones sous-exprimant CD133 ont également été développés à partir d'une lignée de mélanome. Ces clones montrent une réduction de la capacité à former des sphères, de la capacité de migration ainsi qu'une perte du pouvoir tumorigène par rapport à des clones contrôles (Rappa et al. 2008a).

Le marqueur **CD20** (B lymphocyte antigen) est une phosphoprotéine glycosylée présente à la surface de tous les lymphocytes B matures. Sa fonction n'est pas formellement identifiée mais des éléments laissent croire qu'il pourrait s'agir d'un canal calcium. Ce marqueur de différenciation lymphoïde a été retrouvé dans une population de mélanome cultivée dans des conditions non adhérentes. Les cellules CD20 triées ont également été définies plus tumorigènes chez la souris SCID (Fang et al. 2005). Une étude plus récente s'est intéressée à CD20 et a retrouvé ce marqueur sur la grande majorité des échantillons de patients. L'expression de ce marqueur est maintenue par des conditions de culture non adhérentes et ne l'est pas dans des conditions de culture classiques. Des lymphocytes T ciblant spécifiquement CD20 ont ensuite été développés et un traitement par ces cellules entraîne une régression totale et durable de tumeurs de mélanome ne contenant pourtant pas plus de 2% de cellules exprimant CD20 chez la souris (Schmidt et al. 2011).

JARID1B est une histone déméthylase très présente dans les tissus en régénération (testicule et moelle osseuse) et qui est impliquée dans le développement des cellules souches somatiques ainsi que des cancers. Dans le cas du mélanome, il a été montré que les cellules exprimant JARID1B définissent une sous-population faiblement proliférante mais capable de donner des progéniteurs rapidement proliférants. Cependant aucune différence de tumorigénicité n'a été visualisée entre les cellules exprimant ou non JARID1B (Roesch et al. 2010).

Les transporteurs ABC seraient impliqués dans le maintien d'un phénotype indifférencié. En effet, le transporteur ABCG2 est sur-exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques et embryonnaires (Sarkadi et al. 2010). De plus, sa sur-expression inhibe le développement hématopoïétique normal. De même une sur-expression d'ABCB1 dans des cellules myogéniques C2C12 bloque la différenciation et la formation de myotubes (pour revue, Hadnagy et al. 2006). **ABCB1** est exprimé sur une sous-population de culture primaire de mélanomes humains représentant entre 1 et 10% de la population totale. La proportion de cellules exprimant ABCB1 augmente dans des conditions de culture pour cellules souches de façon corrélée à une perte de pigmentation. Les cellules de mélanome ABCB1⁺ triées sont plus clonogéniques que les cellules ABCB1⁻ et possède une plus grande capacité d'auto-renouvellement *in vitro* (Keshet et al. 2008). Il a également été évoqué qu'**ABCG2** puisse être un marqueur de cellules CRIM (Monzani et al. 2007).

Parmi les marqueurs de la seconde catégorie, on retrouve CD271, un marqueur utilisé pour isoler les cellules souches de la crête neurale ; Nestine, CD34 et le transporteur ABCB5.

Des échantillons de patients ont été analysés puis triés sur la base de l'expression de **CD271** avant d'être injectés en présence de matrigel dans des souris RG (Rag2^{-/-}γc^{-/-}) (animaux déficients en lymphocytes T et B ainsi qu'en cellules NK). Les cellules exprimant CD271 sont présentes dans 9 tumeurs sur 10 dans des proportions variant entre 2,5 à 40% de la population totale. Elles sont également plus tumorigènes que les cellules n'exprimant pas CD271. De plus, les cellules CD271 reforment *in vivo* une population hétérogène (Boiko et al. 2010).

La **nestine** est un filament intermédiaire exprimé dans les cellules souches et progénitrices du système nerveux central. Il a été montré que la nestine est plus exprimée dans les stades tardifs du développement du mélanome mais aucun essai de tumorigénicité n'a été effectué sur les cellules exprimant la nestine (Florenes et al. 1994 ; Klein et al. 2007).

Le marqueur **CD34** est présent au niveau des cellules souches adultes de mélanocytes au niveau du renflement du follicule pileux et le marqueur **p75** est considéré comme un marqueur de cellules souches de la crête neurale. Il a été montré dans un modèle de souris nude que les cellules exprimant CD34 étaient plus tumorigènes que les cellules ne l'exprimant pas, cependant, les cellules exprimant p75 sont au contraire moins tumorigènes que les cellules ne l'exprimant pas (Held et al. 2010).

ABCB5 a également été étudié en tant que marqueur de cellules CRIM. Ces éléments seront détaillés dans la suite de l'étude.

1.1.2 Identification de cellules CRIM à partir de culture 3D *in vitro*

La culture de lignées tumorales en milieux particuliers, notamment utilisés pour le maintien de cellules souches embryonnaires ou somatiques, a permis d'observer la formation de sphères dans différents modèles. Ces structures ont tout d'abord été développées dans le cas de cancer du sein (mammosphères) (Ponti et al. 2005) et du cerveau (neurosphères) (Singh et al. 2004) mais également dans le cas du mélanome sous la forme des mélanosphères.

La première étude évoquant de telles structures pour le mélanome avait montré que certains prélèvements de mélanomes de patients étaient capables de former des mélanosphères dans un milieu pour cellules totipotentes (Fang et al. 2005). Deux autres études avaient ensuite montré que des lignées de mélanome (Rappa et al. 2008b) et près de

50% de métastases ganglionnaires de patients atteints de mélanome (Perego et al. 2010) avaient également la capacité à former des sphères dans des milieux de cellules souches.

L'ensemble de ces travaux avait évalué *in vivo* le caractère initiateur de tumeur des cellules cultivées en sphères par rapport aux mêmes cellules cultivées en monocouche, concluant que les cellules de mélanome cultivées sous forme de sphères avaient un pouvoir tumorigène plus élevé (Fang et al. 2005 ; Rappa et al. 2008b ; Perego et al. 2010). Il a également été montré que les cellules cultivées en sphères possédaient des caractéristiques d'auto-renouvellement et de différenciation (Fang et al. 2005). De plus des expériences de xénogreffes en série montrent le caractère d'auto-renouvellement de ces cellules de mélanosphères *in vivo* ainsi que leur capacité à régénérer une tumeur hétérogène (Perego et al. 2010).

Enfin l'expression de marqueurs de cellules indifférenciées a été étudiée. Ainsi il a tout d'abord été montré que ces sphères expriment des marqueurs de mélanocytes (Melan-A/MART-1 et HMB45) (Perego et al. 2010) mais également des marqueurs de cellules souches tels que le marqueur CD20 (Fang et al. 2005) ou les marqueurs Sox2, Oct3/4, CD24, CD73, CD166 et CD133 (Perego et al. 2010).

1.1.3 Identification d'une « Side Population » enrichie en cellules CRIM

L'existence d'une « Side Population » (SP) est décrite par la présence de cellules possédant la particularité d'effluer des colorants lipophiles. Les cellules SP ont été identifiées pour la première fois en 1996 par Goodell en utilisant le colorant Hoechst 33342 (Goodell et al. 1996). Le colorant Hoechst 33342 se fixe à l'ADN et permet donc d'analyser les phases d'un cycle cellulaire. La détection simultanée des spectres d'émission du Hoechst 33342 dans le rouge et le bleu montre un gradient d'intensité du colorant qui permet de visualiser une sous-population dite SP. Initialement étudiée dans la moelle osseuse, cette sous-population a été décrite comme enrichie en cellules souches même si cela reste controversé. Très tôt, les transporteurs ABC et notamment ABCB1 et ABCG2 ont été associés à ce phénotype. Ainsi, ABCB1 est capable d'effluer le colorant Hoechst 33342 et son inhibition par le vérapamil conduit à une disparition de la population SP. De même, la protéine ABCG2 pourrait être impliquée dans ce phénotype. Pourtant la corrélation n'est pas parfaite puisque dans la moelle osseuse, ABCB1 est exprimé dans 65% des cellules alors que seulement 0,1% présentent un caractère SP (pour revue Hadnagy et al. 2006).

Une étude sur des cellules de mélanome murin (B16F10) a montré qu'une population SP est visualisable et que ces cellules sont plus clonogéniques que le reste de la population. Dans des conditions de culture sans sérum, les cellules SP sont capables de proliférer sous forme de sphères tandis que la population restante périclute dans les mêmes conditions de culture. Ces cellules SP sont également plus tumorigènes que les non SP dans un modèle de souris C57BL/6. Elles sont aussi plus résistantes à la vincristine que les cellules non-SP de façon corrélée à une expression plus importante d'ABCG2. Enfin, ces cellules contiennent plus de cellules positives pour les marqueurs CD133, CD44 et CD24 que les cellules non SP (Dou et al. 2009).

Une side-population définie sur la base du faible marquage par le colorant Hoechst 33342 et disparaissant sous l'effet du vérapamil, a également été mise en évidence sur des lignées de mélanomes humains. Cette sous-population caractérise des cellules de très petite taille et présentant un taux de prolifération réduit ainsi qu'une plus grande capacité à se maintenir en culture par rapport à des cellules de plus grande taille. Les cellules SP sont également plus tumorigènes que les cellules non SP dans un modèle de souris nude (Grichnik et al. 2006).

Une seconde étude sur des cellules de mélanome humain confirme la présence d'une population SP. La proportion de ces cellules apparaît augmentée lorsque les cellules sont cultivées en 3D. Les transporteurs ABCG2 et ABCB1 ne semblent pas impliqués dans ce phénotype. Cependant, ABCB5 est plus exprimé dans les cellules SP par rapport aux cellules non SP. (Fukunaga-Kalabis et al. 2010).

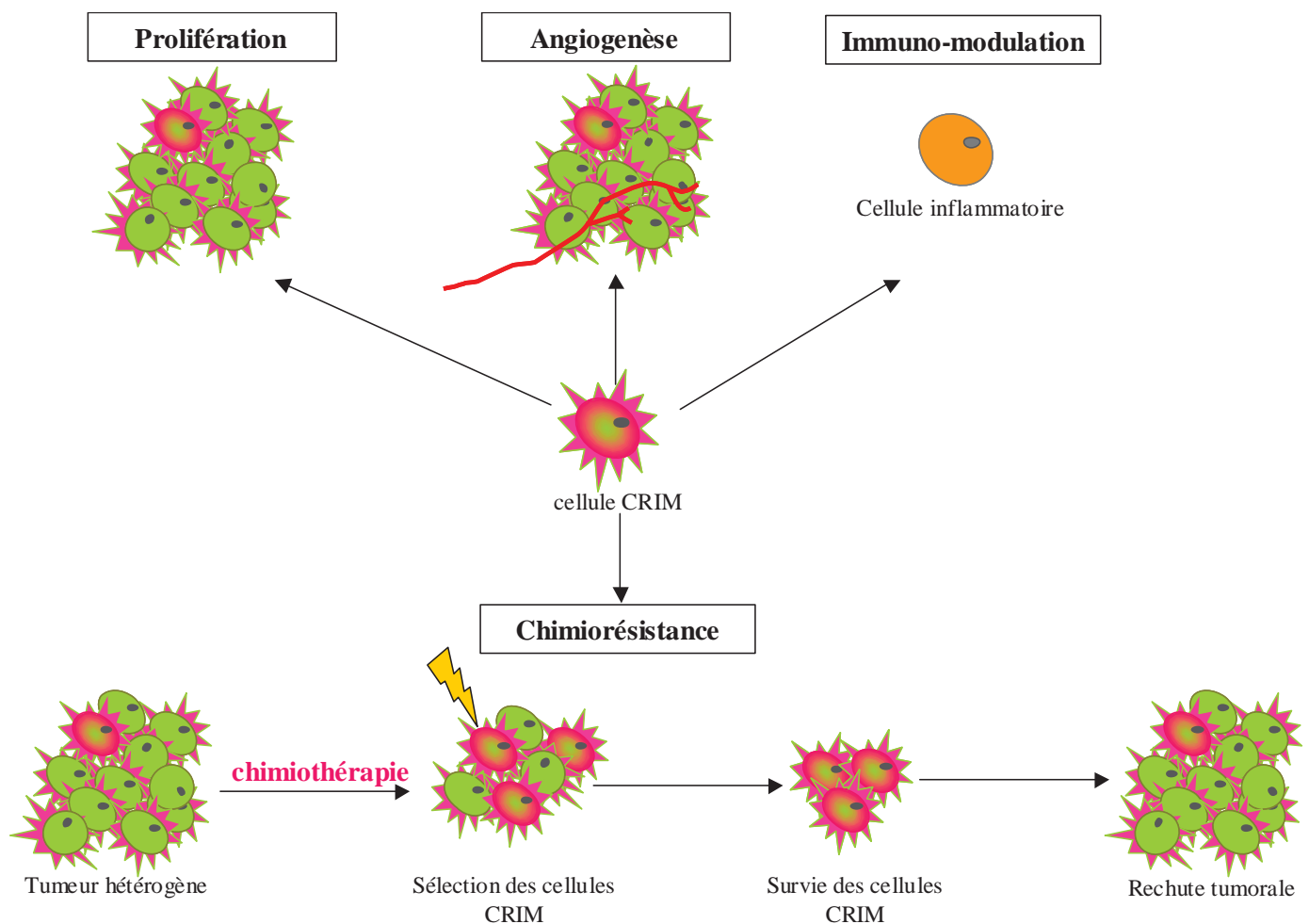


Figure 25 : Le modèle des cellules CRIM apporte une explication à la chimiorésistance et à la récurrence tumorale

Le modèle des cellules souches cancéreuses propose que les cellules CRIM possèdent la capacité de réguler à la fois la prolifération et également de contrôler leur micro-environnement en agissant sur la neo-angiogenèse et la modulation de la réponse immune. Ce modèle prête également aux cellules CRIM des propriétés de résistance à la chimiothérapie par des propriétés propres aux cellules souches somatiques.

1.2 Le modèle des cellules CRIM permet d'apporter une explication à la chimiorésistance

Selon le modèle des cellules souches cancéreuses, seule une faible proportion de cellules cancéreuses possède la capacité d'assurer la progression tumorale. Ces cellules présenteraient un caractère indifférencié associé à un potentiel de différenciation, de prolifération et d'auto-renouvellement leur permettant de produire un grand nombre de cellules filles formant la masse tumorale. Les cellules souches tumorales posséderaient également la capacité de contrôler leur micro-environnement en favorisant notamment l'angiogenèse tumorale ou en inhibant la réponse immunitaire anti-cancéreuse (Frank et al. 2011 ; Schatton et al. 2010). De façon comparable aux cellules souches saines qui sont très résistantes à toutes sortes de dommages environnementaux, cette sous-population semble également être plus résistante à la chimiothérapie (figure 25). Cette plus grande résistance serait associée avec un état de quiescence, une plus grande expression des voies de réparation de l'ADN et des transporteurs ABC ainsi qu'une résistance à l'apoptose. Ces différentes caractéristiques leur permettent de survivre sélectivement à la chimiothérapie et de conserver leur potentiel à reformer une tumeur ou une métastase (figure 25) (pour revue Ma et al. 2010a ; Zabierowski et al. 2008; Girouard and Murphy 2011).

Même si aucune donnée expérimentale n'est aujourd'hui en mesure de le confirmer, le modèle des cellules CRIM pourrait donc décrire une sous-population cellulaire aux caractéristiques agressives et résistantes qui pourraient être la source de la récurrence du mélanome en clinique. Dans d'autres modèles tumoraux, des transporteurs ABC ont été impliqués dans ce phénotype et dans le cas du mélanome, le transporteur ABCB5 a notamment été mis en lumière.

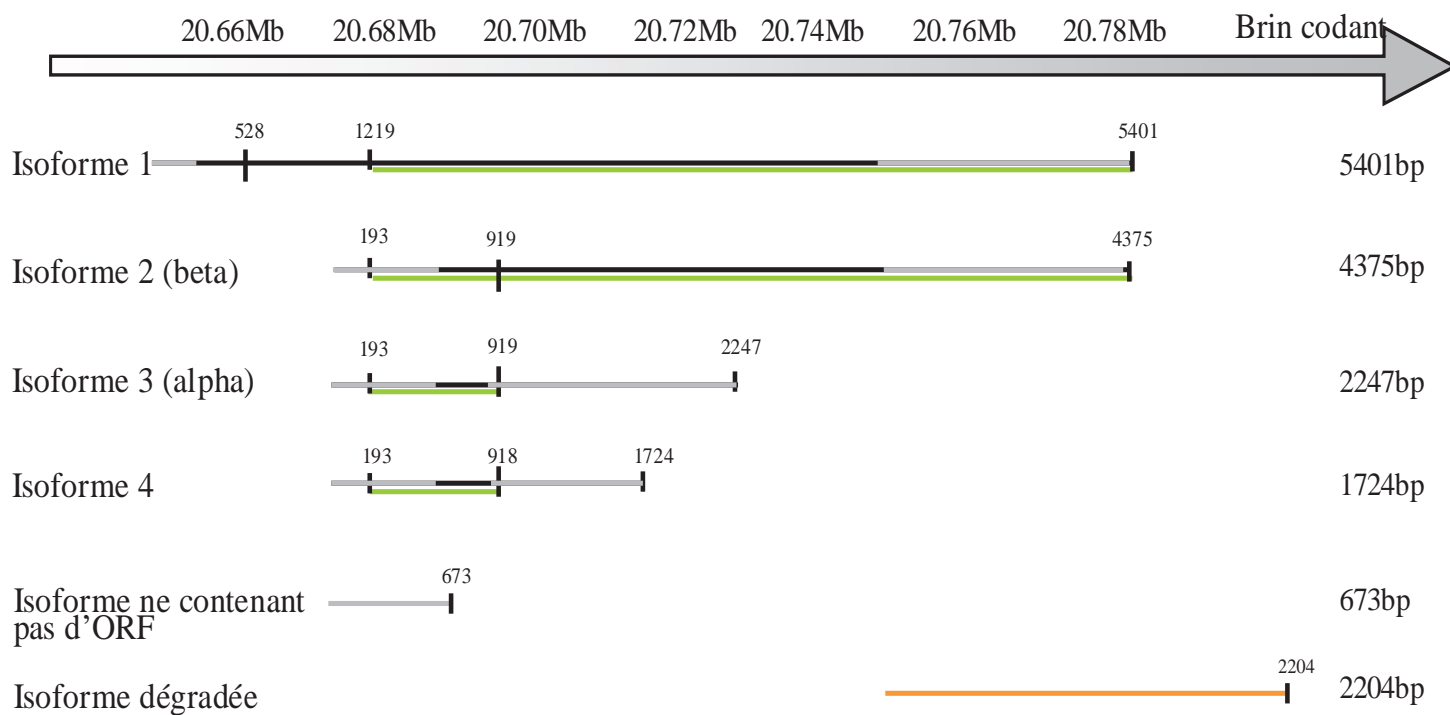


Figure 26 : Les différentes isoforme d'ABCB5

Le gène ABCB5 possède différents transcripts. Les quatre isoformes numérotées de 1 à 4 sont potentiellement codantes. Parmi les deux isoformes non codantes, une ne possède pas de cadre de lecture ouvert (ORF) (en gris) et une est éliminée par le système de dégradation des ARNs non-sens (en orange). Les ORF sont en noires et les zones non codantes en gris. Les identités de séquence sont soulignées en vert.

2 ABCB5 ET LE MELANOME METASTATIQUE : DONNEES SUR L'AGRESSIVITE ET LA CHIMIORESISTANCE

2.1 ABCB5 : un transporteur à la structure encore controversée

Le gène d'ABCB5 a été isolé pour la première fois en 1996 (Allikmets et al. 1996) suite à une recherche d'homologie avec la partie N-terminale de la séquence d'ABCB1 dans la base de données des séquences EST (pour Expressed Sequence Tag). La séquence décrite dans cette étude (ncbi accession number N24315.1) correspond à un fragment de 204pb de l'isoforme 3 (selon la nomenclature du NCBI adoptée dans ce manuscrit) d'ABCB5 également connue comme isoforme alpha. Le gène d'ABCB5, situé au locus 7p21.1 pour l'espèce humaine, a depuis été identifié chez d'autres espèces dont certaines très proches de l'Homme avec le chimpanzé ainsi que d'autres mammifères tels que les rongeurs, les bovins, les chevaux, les loups et les lapins. On trouve également un gène ABCB5 chez les amphibiens et les poissons. On suppose également qu'ABCB5 est présent chez des espèces beaucoup plus éloignées notamment chez l'amibe, un eucaryote inférieur. ABCB5 est très proche des autres transporteurs de la famille ABCB pleine taille tels que ABCB1, ABCB4 ou ABCB11.

La protéine ABCB5 chez l'Homme a été étudiée à partir de 2003 avec le clonage et l'étude d'une séquence correspondant à l'isoforme 2 également appelée isoforme beta (ncbi accession number AY234788) (Frank et al. 2003). Une deuxième étude s'est ensuite intéressée à la présence d'isoformes alternatives et a identifié deux isoformes différentes dénommées isoformes alpha et beta (respectivement connues aujourd'hui comme isoforme 3 et isoforme 2) (Chen et al. 2005). Enfin plus récemment, deux équipes ont en parallèle découvert dans des cellules de testicules la présence d'une isoforme plus longue appelée isoforme 1 (Sugimoto 2007 ; Chen et al. 2005). Une isoforme 4, plus courte a également été décrite. On compte aujourd'hui six transcripts différents pour le gène ABCB5 humain (figure 26). Les deux derniers transcripts n'ont encore pas été étudiés. L'un d'eux ne contient pas de cadre de lecture ouvert de lecture (ou ORF pour Open Reading Frame) et le second est éliminé par le système de dégradation des ARN non-sens (ou Nonsense mediated decay). L'ensemble des séquences de cDNA décrites pour le gène ABCB5 est listé dans l'annexe 3.

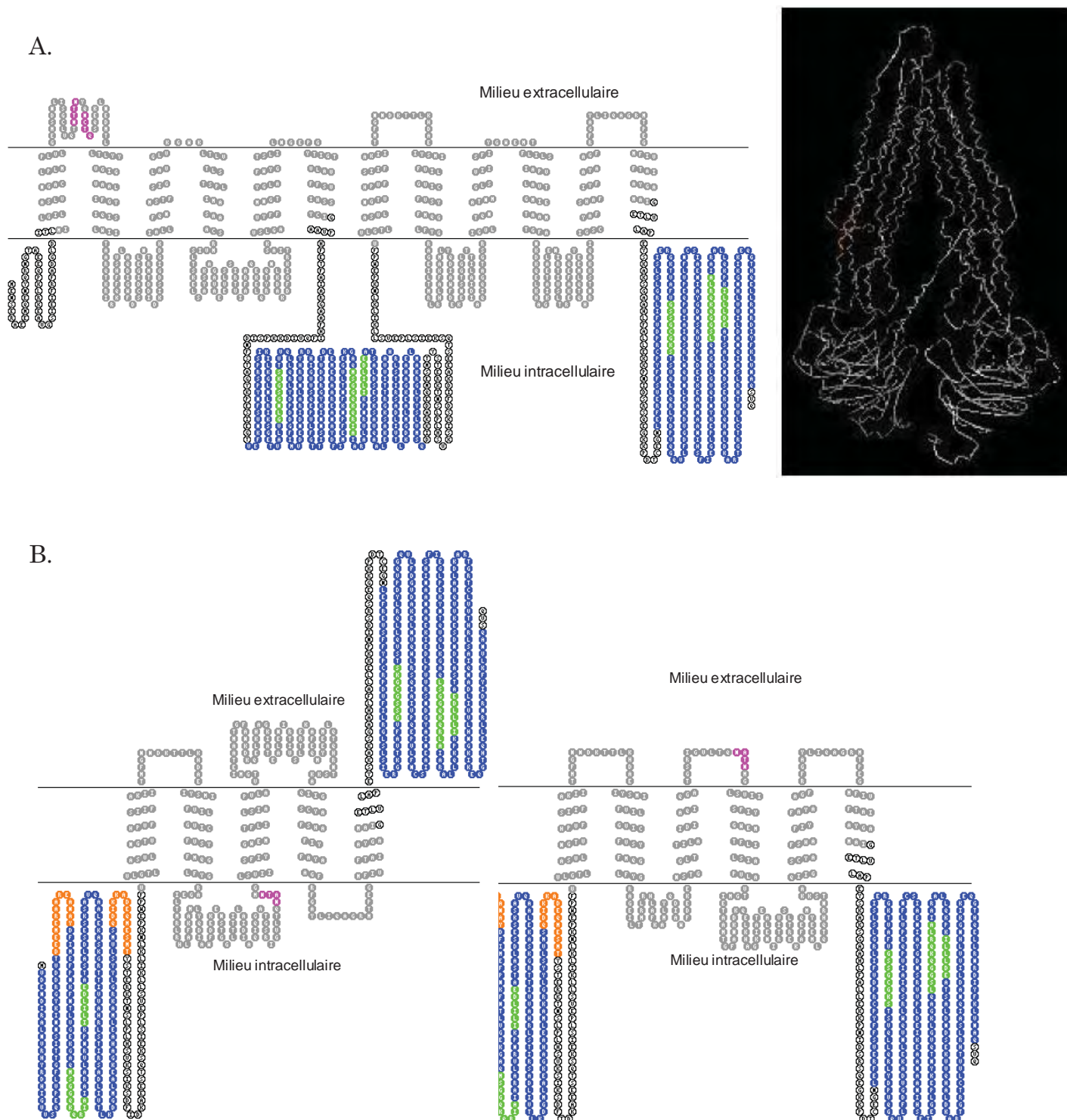


Figure 27 : Les modèles de structures d'ABCB5

Les modèles de structures secondaires des isoformes 1 et 2 d'ABCB5 sont décrits avec les domaines NBD en bleu, les domaines TMD en violet, les sites de glycosylation en rose, les Walkers A et B et le motif C en vert et les domaines coiled-coil en orange.

A. L'isoforme 1 présente une structure semblable à celle d'ABCB1, conforme à l'organisation canonique avec deux domaines NBD intracellulaires et deux domaines transmembranaires. Une représentation 3D réalisée au sein de l'équipe par J. Riond et L. Murray est également présentée.

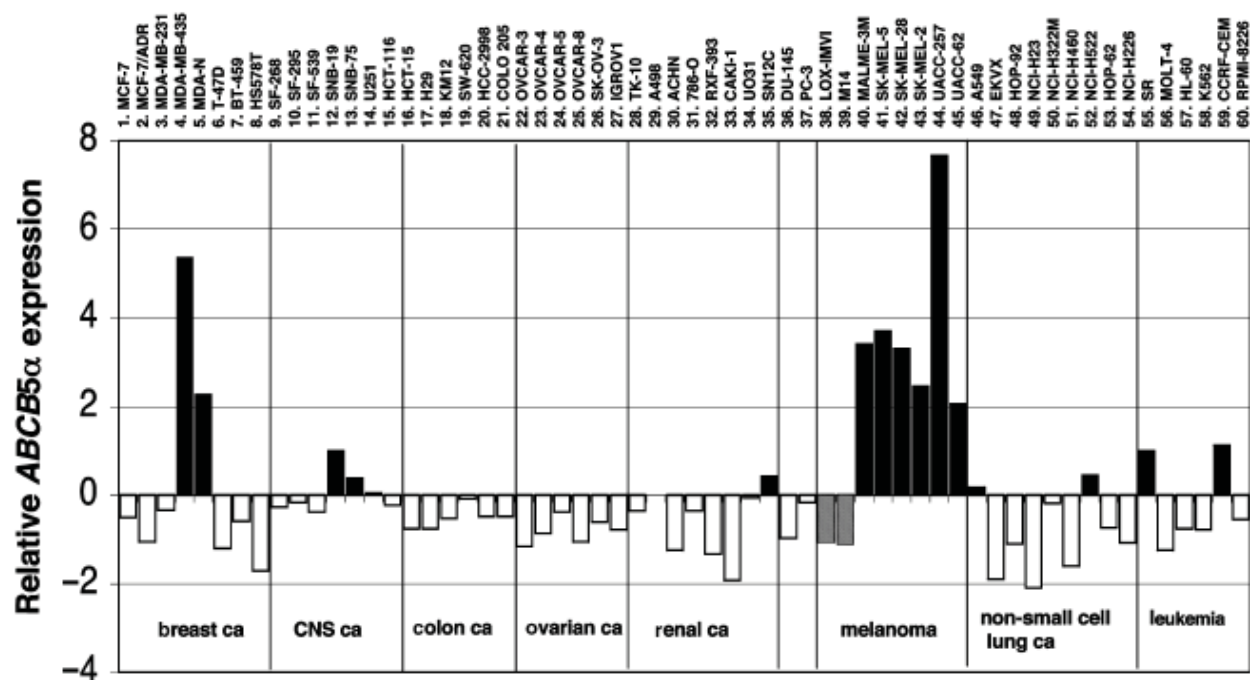
B. Deux modèles de structure existent pour l'isoforme 2. Le premier modèle propose 5 hélices transmembranaires avec un domaine NBD extracellulaire (schéma de gauche). Le deuxième modèle propose 6 hélices transmembranaires avec un domaine NBD intracellulaire (schéma de droite).

Les isoformes 3 et 4 correspondent respectivement à des protéines potentielles de 15 kDa et 14 kDa. L'analyse de leurs séquences révèle qu'elles ne contiennent qu'un Walker B et un motif C ne permettant pas la formation d'un domaine NBD fonctionnel. Elles ne possèdent pas non plus de domaine transmembranaire. Un rôle de régulation leur est donc prêté (Moitra et al. 2011).

L'isoforme 1 correspond à une protéine potentielle de 1257 acides aminés soit un poids moléculaire théorique de 140 KDa. Elle est à 76% homologue à ABCB1 et partage 56% d'identité avec ce dernier. Les prédictions de structures secondaires lui prêtent une organisation canonique identique à celle d'ABCB1. L'isoforme 1 posséderait 8 sites de glycosylation potentiels dont 2 qui permettraient l'adressage à la membrane (figure 27 A.). 23 polymorphismes non silencieux ont été identifiés pour l'isoforme 1 dont certains pourraient modifier l'activité ATPase ou l'interaction avec le substrat.

L'isoforme 2 quant à elle correspond à une protéine de 812 acides aminés soit un poids théorique de 90 KDa. Sa séquence ne correspond pas au modèle canonique des transporteurs ABC. Elle est en effet composée d'un premier domaine NBD incomplet en N-terminal (à acuse d'un Walker A manquant), d'un domaine TMD et d'un deuxième domaine NBD complet en C-terminal. Deux modèles de structures ont été proposés pour cette isoforme qui présente des caractéristiques spécifiques et qui ne correspond pas aux modèles canoniques de transporteurs pleine-taille ou d'hémi-transporteurs. Le premier modèle propose un domaine TMD possédant 5 hélices transmembranaires avec un domaine NBD N-terminal extracellulaire (Frank et al. 2003). Dans le deuxième modèle, construit par analogie avec ABCB1 et ABCB5 isoforme 1, le domaine TMD possède 6 hélices transmembranaires positionnant ainsi les deux domaines NBDs en intracellulaire ce qui serait plus cohérent avec une activité ATPase (Moitra et al. 2011 ; Lionel Murray et Joëlle Riond au laboratoire). Les deux modèles de structure sont présentés dans la figure 27 B. Pour l'isoforme 2, une analyse des domaines coiled-coil prédit deux sites de dimérisation possibles au niveau N-terminal (régions 46 à 60 et 176 à 191) tout comme cela a été envisagé pour l'hémi-transporteur ABCG2 (Moitra et al. 2011). La question de la structure et de la fonctionnalité du transporteur ABCB5 est donc encore ouverte.

A.



B.

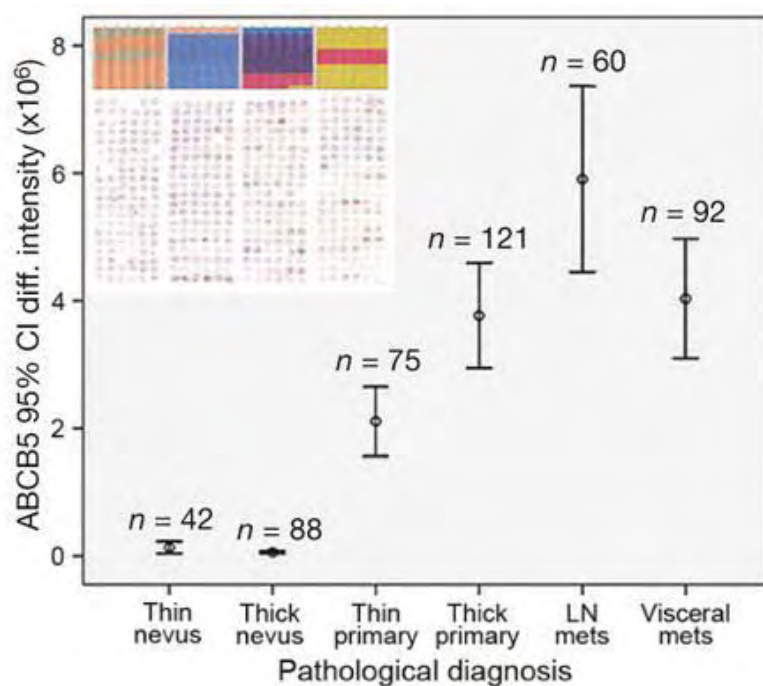


Figure 28 : ABCB5 est un marqueur d'agressivité du mélanome

A. L'analyse de l'expression relative de l'ARNm d'ABCB5 dans le panel NCI60 des lignées cancéreuses montre qu'ABCB5 est exprimé préférentiellement dans les mélanomes. Cette figure est tirée de Chen et al. 2005.

B. L'analyse de l'expression de la protéine ABCB5 en tissus-array montre que l'expression d'ABCB5 est corrélée positivement avec l'évolution du stade du mélanome. Cette figure est tirée de Schatton et al. 2008.

2.2 ABCB5 : marqueur d'agressivité spécifique du mélanome

2.2.1 ABCB5 est exprimé préférentiellement dans les lignées mélanocytaires

Les premières séquences d'ABCB5 ont initialement été isolées à partir de mélanocytes et de mélanome (Allikmets et al. 1996 ; Frank et al. 2003 ; Chen et al. 2005).

Dans un premier temps l'expression d'ABCB5 a été analysée dans quelques tissus sains (mélanocytes, sang périphérique ou cellules épithéliales de l'intestin) et n'a été retrouvée que dans les mélanocytes. Son profil d'expression a ensuite été analysé à de nombreuses reprises dans tissus ou de lignées cellulaires d'abord à petite échelle (Taipalensuu et al. 2001 ; Frank et al. 2003) puis sur des panel plus importants. Des études ont notamment été menées sur les 60 lignées du NCI (National Cancer Institut) dans lesquelles ABCB5 apparaît comme préférentiellement exprimé dans la pathologie du mélanome avec des exceptions observées pour des cas isolés de lignées de cancers du sein (MDA-MB-231 et MDA-MB-435, identifiés depuis comme un mélanome mal diagnostiqué (Rae et al. 2007)), de leucémies et de glioblastomes (Szakacs et al. 2004 ; Huang et al. 2004 ; Chen et al. 2005) (figure 28A.). Ces données furent ensuite confirmées sur des prélèvements cliniques de mélanome avec une expression d'ABCB5 détectée dans 90 à 100% des cas de mélanome (Frank et al. 2005 ; Vasquez-Moctezuma et al. 2010). Des études sur ABCB5 ont également porté sur d'autres pathologies cancéreuses et son expression a été retrouvée dans des leucémies ainsi que dans des cellules sanguines non cancéreuses (Lehne et al. 2009 ; de Grouw et al. 2006), dans des cancers du foie (Cheung et al. 2011) et des cancers colo-rectaux (Wilson et al. 2011) mais pas dans les tissus sains correspondants.

Ces différentes études ont permis d'établir le profil d'expression d'ABCB5 isoforme 2 qui apparaît comme préférentiel de la lignée mélanocytaire pour les tissus sains. Concernant les tissus cancéreux, la conclusion est moins tranchée puisque si ABCB5 est très fortement et très fréquemment retrouvé dans les mélanomes, il semble également présent dans certains cancers comme le foie, le colon ou le sein et dans les leucémies. Concernant l'isoforme 1, aucune étude ne décrit à ce jour une expression dans des tissus autres que les testicules. L'isoforme 3 quant à elle semble avoir un profil d'expression similaire à celui de l'isoforme 2 avec une expression spécifique de la lignée mélanocytaire et de son dérivé cancéreux, le mélanome (Chen et al. 2005). Concernant l'isoforme 4, très peu d'études sont disponibles mais une équipe la décrit comme présente de façon ubiquitaire dans les tissus sains et cancéreux (Frank et al. 2009).

2.2.2 L'expression d'ABCB5 est corrélée au développement du mélanome

Etant donné la très forte expression d'ABCB5 dans les mélanomes, des études se sont penchées sur l'évolution de son expression pendant le développement de la maladie. Dans les premiers travaux, ABCB5 a été trouvé autant voire moins exprimé dans les lignées de mélanomes que dans les mélanocytes sains (Chen et al. 2005 ; Heimerl et al. 2007). Cependant des études sur des prélèvements cliniques de patients à plus ou moins grande échelle ont ensuite montré qu'ABCB5 était plus exprimé dans les mélanomes par rapport à des nævus bénins. Ces mêmes études ont également corrélé l'expression d'ABCB5 à l'évolution de la maladie avec une expression plus importante dans les métastases que dans les tumeurs primaires. Il convient de noter que les métastases viscérales semblent exprimer moins d'ABCB5 que les métastases ganglionnaires (Figure 28 B.) (Schatton et al. 2008 ; Sharma et al. 2010). Il faut également noter l'expression d'ABCB5 au niveau des ganglions lymphatiques de certains patients mais cette expression n'a pas été corrélée à la survie (Gazzaniga et al. 2010). De même, une étude chez la souris montre qu'ABCB5 est exprimé dans les cellules circulantes de mélanome de façon plus importante que dans les tumeurs primaires, les ganglions lymphatiques ou les métastases pulmonaires. De plus l'expression d'ABCB5 dans les cellules circulantes de mélanome est plus importante pour les patients présentant des métastases (Ma et al. 2010b).

ABCB5 semble donc être un marqueur de l'agressivité du mélanome. De plus, l'expression d'ABCB5 est plus importante dans les patients de courte survie par rapport aux patients de longue survie faisant d'ABCB5 un marqueur pronostique potentiel (Sharma et al. 2010).

2.3 ABCB5 : marqueur de cellules CRIM ?

2.3.1 Les cellules exprimant ABCB5 sont-elles des cellules CRIM ?

Plusieurs éléments de la littérature argumentent qu'ABCB5 pourrait être un marqueur de cellules résistantes initiatrices de mélanome (CRIM). Tout d'abord, l'ensemble des études s'accordent à dire que l'expression d'ABCB5 est restreinte à une sous-population minoritaire des lignées de mélanome et des échantillons cliniques (Frank et al. 2003 ; Frank et al. 2005 ; Keshet et al. 2008 ; Schatton et al. 2008 ; Fukunaga-Kalabis et al. 2010). La fréquence de cette sous-population varie entre 1 à 15% suivant les études.

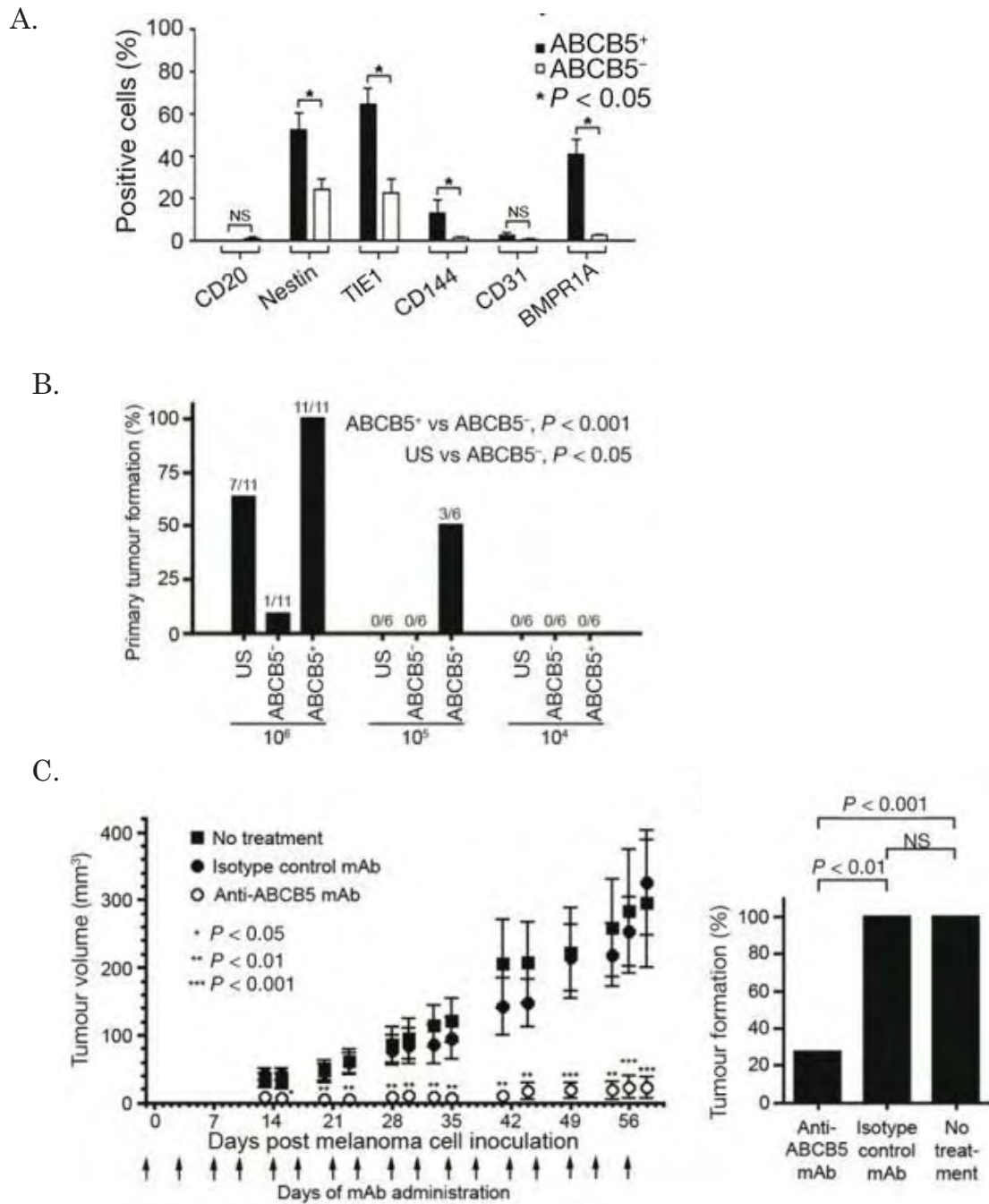


Figure 29 : ABCB5 est un marqueur de cellules CRIM

A. L'analyse de l'expression protéique de différents marqueurs identifiés comme marqueur de cellules CRIM dans les populations exprimant ou non ABCB5 montre que la population exprimant ABCB5 est enrichie en marqueurs de cellules CRIM. Cette figure est tirée de Schatton et al. 2008.

B. Les populations exprimant ou non ABCB5 ont été triées et injectées chez la souris immuno-déprimée en dilution en série. La population exprimant ABCB5 apparaît plus tumorigène que les populations non triées et triées ABCB5 négative. Cette figure est tirée de Schatton et al. 2008.

C. Le traitement par un anti-corps anti-ABCB5 des souris xénogreffées entraîne une inhibition de la formation de tumeur (graphique de droite) ainsi qu'une inhibition de la croissance tumorale (graphique de gauche). Cette figure est tirée de Schatton et al. 2008.

De plus, ABCB5 est impliqué dans le potentiel de membrane et participe à la régulation de fusion cellulaire, phénotype généralement attribué à des cellules non différenciées comme moyen de garantir l'hétérogénéité de la population cellulaire (Frank et al. 2003). L'expression d'ABCB5 semble également être le reflet d'une hiérarchisation cellulaire, puisque des cellules exprimant ABCB5 sont capables de reformer une population cancéreuse hétérogène composée de cellules ABCB5 positives et négatives *in vitro* et *in vivo* alors que les cellules ABCB5 négatives ne possèdent pas cette capacité de différenciation (Frank et al. 2005 ; Schatton et al. 2008). L'expression d'ABCB5 apparaît également corrélée à des tissus non différenciés puisqu'il est exprimé dans des zones non mélaniques et non différenciées sur des échantillons cliniques (Schatton et al. 2008). De même, une induction de la différenciation de cellules de mélanome par l'extinction d'APP (β -Amyloid Precursor Protein) entraîne une augmentation de marqueurs de différenciation tels que TRP1 et MITF ainsi qu'une mort cellulaire accompagnée par une sous-expression d'ABCB5 (Botelho et al. 2010).

Les cellules exprimant ABCB5 sont également enrichies en cellules exprimant divers marqueurs dits « de cellules souches cancéreuses » tels que CD133, CD166, CD25, CD44, CD20, CD271, Nestin, TIE-1, CD144, CD31, BMPR1A et ABCB1 (Frank et al. 2003 ; Frank et al. 2005 ; Schatton et al. 2008 ; Keshet et al. 2008 ; Frank et al. 2011) (figure 29 A.). Ceci est également vrai sur des échantillons de patients puisque sur les patients exprimant ABCB5, plus de la moitié expriment également CD133 (Gazzaniga et al. 2010 ; Sharma et al. 2010). De plus, ABCB5 est plus fortement exprimé dans les cellules SP que dans la population totale (Fukunaga-Kalabis et al. 2010).

Enfin, il a été montré après tri cellulaire et injections en dilutions limites sur souris NOD/SCID, que la fraction exprimant ABCB5 est plus tumorigène que la fraction n'exprimant pas ABCB5 ou que les cellules non triées (figure 29 B.) (Schatton et al. 2008). Comme discuté précédemment, ce résultat est controversé et les propriétés de tumorigénicité décrites ont été attribuées au statut immunitaire des souris utilisées (Quintana et al. 2008; Quintana et al. 2010). Cette expérience a été reproduite avec des souris NSG plus immuno-déprimées donnant un résultat identique à celui obtenu avec les souris NOD/SCID (Frank et al. 2011). De plus un traitement avec un anticorps monoclonal anti-ABCB5 *in vivo* permet une inhibition de la croissance tumorale (figure 29 C.) (Schatton et al. 2008). Il apparaît donc que les cellules exprimant ABCB5 possèdent des caractéristiques de cellules moins différenciées que la majorité de la population cellulaire d'un mélanome et que ce phénotype indifférencié serait associé à un caractère initiateur de tumeur.

Dans d'autres types tumoraux, il a également été montré que les cellules exprimant ABCB5 pouvaient correspondre à une population non différenciée. Ainsi dans un modèle de leucémie, les cellules exprimant ABCB5 sont retrouvées au sein de la population CD34⁺/CD38⁻ correspondant à un phénotype de type cellules souches. De même dans le cancer du foie, il a été montré que l'expression d'ABCB5 est régulée par un facteur de transcription appelé GEP (pour Granulin-Epithelin Precursor) et que les cellules exprimant GEP et ABCB5 co-expriment CD133 et EpCAM, deux marqueurs d'un phénotype peu différencié (Cheung et al. 2011). Dans le cas des cancers colo-rectaux, ABCB5 est également co-exprimé avec le marqueur CD133 (Wilson et al. 2011).

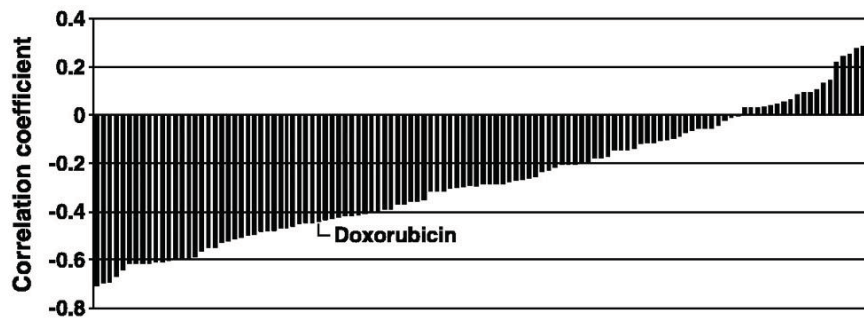
2.3.2 Les cellules exprimant ABCB5 au sein du micro-environnement tumoral

Les cellules exprimant ABCB5 ont ensuite été étudiées pour leur capacité à interagir avec leur micro-environnement et promouvoir la croissance tumorale.

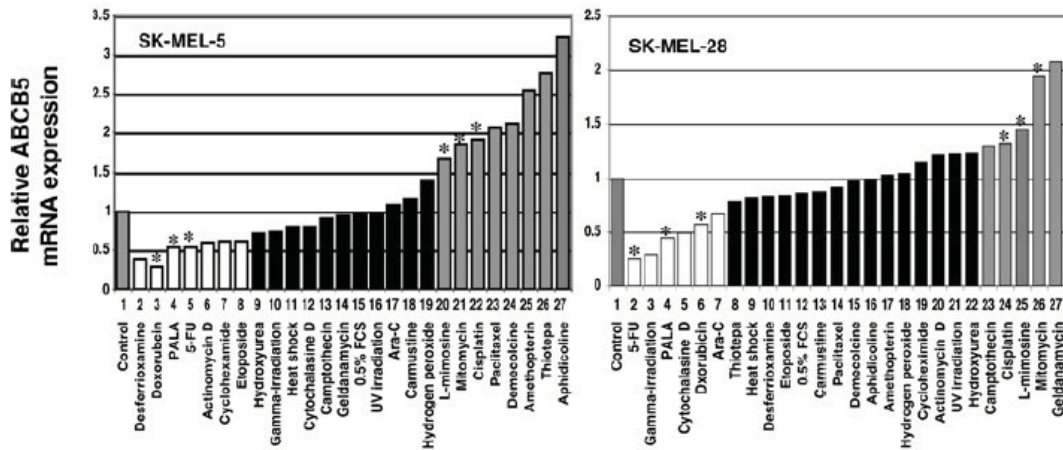
Les cellules de mélanomes expriment pour la quasi-totalité le CMH de classe I mais très peu montrent une expression du CMH de classe II. De manière intéressante, les cellules exprimant ABCB5 présentent un profil complètement différent puisqu'elles expriment fortement le CMH de classe II et moins de CMH de classe I. Elles présentent également à leur surface des profils d'expression différents avec plus d'expression de marqueurs 4-1 BBl, B7.2 et PD-1 et une sous-expression des MAAs (Melanoma Associated Antigens). Une co-culture des cellules triées ABCB5 positives avec des lymphocytes humains montre une plus grande inhibition de croissance de lymphocytes par les cellules exprimant ABCB5 que par les cellules ne l'exprimant pas ou les cellules non triées (Schatten et al. 2010).

Une étude micro-array sur des cellules triées ABCB5 positives ou négatives a montré que les cellules positives pour ABCB5 expriment différemment un grand nombre de gènes. Parmi les voies identifiées, celles de la vasculogénèse et de l'angiogénèse ont été étudiées plus en détail. Les cellules exprimant ABCB5 expriment préférentiellement VEGFR-1 et montrent des signes de développement d'une pseudo-vasculature (vascular mimicry). De plus, les cellules exprimant ABCB5 et VEGFR exposées au VEGF induisent l'expression de CD144 (VE-cadhérine), un marqueur de différenciation vasculaire. Cette étude permet donc de conclure que les cellules exprimant ABCB5 sont impliquées dans le développement d'une néo-vasculature (Frank et al. 2011).

A.



B.



C.

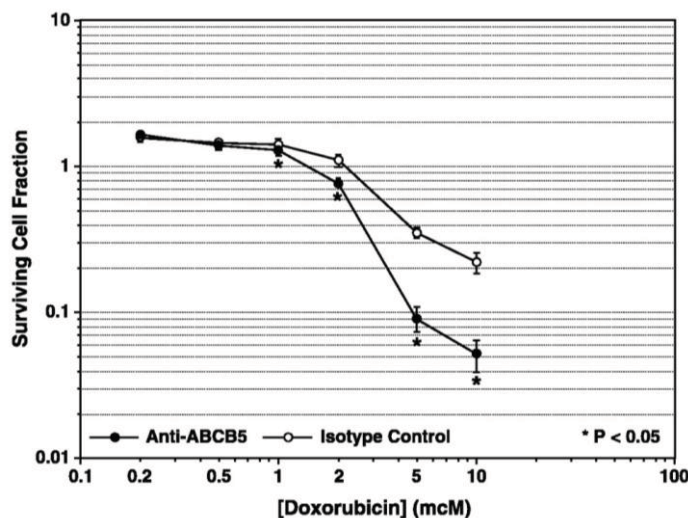


Figure 30 : ABCB5 est associé à la chimiorésistance du mélanome

A. Une analyse de l'expression d'ABCB5 et de la sensibilité à 119 agents cytotoxiques montre une corrélation négative suggérant un lien entre la résistance au produit et l'expression d'ABCB5 pour de nombreux produits dont la doxorubicine. Cette figure est tirée de Frank et al. 2005.

B. L'expression d'ABCB5 dans deux lignées de mélanome a été évaluée par cDNA dot blotting suite à différents type de traitements montrant des variations d'expression. Cette figure est tirée de Chen et al. 2005.

C. La lignée de mélanome G-3361 a été traitée aux doses indiquées de doxorubicine pendant 24h en présence ou non d'anticorps anti-ABCB5 mettant en évidence un effet sensibilisateur de l'anticorps anti-ABCB5 face à la doxorubicine. Cette figure est tirée de Frank et al. 2005.

2.4 ABCB5 : acteur de la chimiorésistance du mélanome ?

2.4.1 ABCB5 : des indices de son implication dans la chimiorésistance

Le premier indice de l'implication d'ABCB5 dans la chimiorésistance a été apporté par des études de corrélation entre un panel de 60 lignées cancéreuses (NCI60), la réponse à 119 composés et l'expression des différents transporteurs ABC dont ABCB5. Cette étude a fait ressortir un lien potentiel entre l'expression d'ABCB5 et la résistance à différentes substances. Notamment, l'expression d'ABCB5 dans les lignées de mélanomes corrèle avec la résistance à la camptothécine 7-Cl (Huang et al. 2004). Cette observation a ensuite été reproduite sur un panel plus restreint de 20 lignées montrant une corrélation négative avec 45 agents anti-cancéreux dont la camptothécine et ses dérivés, la doxorubicine ou la gemcitabine (figure 30 A.) (Frank et al. 2005). Dans les cancers du colon, l'expression d'ABCB5 a également été corrélée à la résistance au 5-fluoro-uracile (Wilson et al. 2011).

Il a également été montré qu'ABCB5 est plus exprimé dans une lignée de mélanome sélectionnée pour sa résistance au CDDP par rapport à la lignée sauvage (Frank et al. 2003). De même, au niveau ARN messenger sur des lignées de mélanome, ABCB5 est induit par plusieurs substances chimiothérapeutiques (figure 30 B.) (Chen et al. 2005).

De façon indirecte, des si-RNA dirigés contre le facteur de transcription APP entraînent une diminution de l'expression d'ABCB5 ainsi qu'un effet sensibilisateur au temozolomide, à la doxorubicine et au paclitaxel (Botelho et al. 2010). De même, un siRNA dirigé contre la tenascin C entraîne une sous-expression d'ABCB5 et une sensibilisation à la doxorubicine (Fukunaga-Kalabis et al. 2010).

2.4.2 La protéine ABCB5 est-elle une pompe d'efflux fonctionnelle ?

Des caractéristiques fonctionnelles de la protéine ABCB5 ont ensuite été étudiées par des approches si/shRNA ainsi que par de l'efflux de composés.

Une première étude d'extinction de l'expression d'ABCB5 a été entreprise par des siRNA ciblant spécifiquement l'isoforme 3. Dans cette étude, l'extinction d'ABCB5 au niveau ARNm conduisait à une sensibilisation de la lignée de mélanome SKMEL-28 à la camptothécine, à la camptothecin 10-OH ainsi qu'au 5 Fluoro-uracile mais pas à la mitoxantrone (Huang et al. 2004). Cependant, bien que les différences d'IC₅₀ visualisées soient statistiquement significatives, elles restent tout de même faibles. On peut noter que

l'isoforme 3 pourrait donc avoir un rôle dans la réponse à la chimiothérapie même si cette isoforme n'a pas été plus étudiée et que la très grande majorité des études sur ABCB5 se focalisent sur l'isoforme 2. Une étude sh-RNA ciblant cette fois les isoforme 1 et 2 d'ABCB5 a également été conduite sur trois lignées de mélanomes et a montré que l'extinction d'ABCB5 a un effet sensibilisateur à la doxorubicine pour l'une des trois lignées testées (Elliott and Al-Hajj 2009).

Des études fonctionnelles d'efflux ont également été menées. Un efflux actif de la rhodamine-123 a tout d'abord été proposé. A partir d'une lignée de cancer du sein (MCF7) ne présentant aucune expression d'ABCB5 au niveau basal et transfectée par ABCB5 un efflux de la rhodamine-123 a été visualisée de façon consistante avec la sur-expression d'ABCB5 (14% de cellules exprimant *de novo* ABCB5 et une capacité acquise pour 15% des cellules à effluer la rhodamine-123) (Frank et al. 2003). La rhodamine est donc un substrat potentiel d'ABCB5. Une étude de l'efflux de doxorubicine a également été entreprise et a montré de façon étonnante que les cellules exprimant ABCB5 montrent une plus grande accumulation de doxorubicine. Ce phénotype a été attribué à l'hyperpolarization des membranes observées pour les cellules exprimant ABCB5. Cependant, un traitement avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine ABCB5 induit une augmentation du nombre de cellules fortement positives pour ABCB5. Un effet sensibilisateur d'un traitement avec l'anticorps anti-ABCB5 à la doxorubicine a également été observé (figure 30 C.) (Frank et al. 2005).

2.4.3 La protéine ABCB5 est-elle impliquée dans la résistance de cancers autres que mélanomes ?

Des indices de l'implication d'ABCB5 à la réponse chimiothérapeutique sont également disponibles dans d'autres types tumoraux. Ainsi dans les leucémies, ABCB5 est sur-exprimé dans une lignée résistante à la vincristine par rapport à la lignée de base (Lehne et al. 2009). Dans le cancer du sein, l'expression d'ABCB5 n'est pas modifiée dans une lignée résistante à la doxorubicine, mais un traitement à la doxorubicine associé à la sur-expression du facteur de transcription Y-B1 entraîne une augmentation de l'expression d'ABCB5 (Yang et al. 2010). Dans le cancer du foie, une sur-expression d'ABCB5 a été visualisée dans des lignées résistantes à la doxorubicine et au cisplatine. De plus des siRNA dirigés contre ABCB5 entraînent une plus grande accumulation de doxorubicine ainsi qu'une augmentation de l'apoptose. De plus, l'expression d'ABCB5 est associée à un mauvais pronostic (Cheung et al. 2011). Dans des lignées de cancers du colon, des études shRNA

ciblant ABCB5 ont également été menées et ont permis de montrer une augmentation de l'expression d'ABCB5 suite au traitement au 5-fluoro-uracile dans des échantillons de patients ainsi qu'un effet sensibilisateur du shRNA au 5-fluoro-uracile (Wilson et al. 2011).

OBJECTIFS DE LA THESE

Il existe actuellement une réelle nécessité de comprendre les causes de l'échec thérapeutique et de la chimiorésistance du mélanome ainsi qu'un besoin de développer des cibles innovantes pour faire face à ce défi thérapeutique. Dans ce contexte, ma thèse s'inscrit dans une démarche de compréhension des mécanismes de chimiorésistance du mélanome métastatique par l'étude des cellules exprimant ABCB5.

Je me suis tout d'abord appliquée à développer des outils d'étude de la protéine ABCB5 et des méthodologies pour définir les cellules exprimant ABCB5. J'ai ainsi caractérisé l'expression d'ABCB5 dans plusieurs modèles de mélanomes. J'ai également étudié un modèle cellulaire en trois dimensions appelé mélanosphère permettant d'appréhender différemment la réponse des cellules à la chimiothérapie.

Dans un second temps, j'ai étudié l'impact de la chimiothérapie sur les cellules exprimant ABCB5. Afin d'aborder la chimiosensibilité de cette sous-population, j'ai mis en place une approche permettant d'évaluer l'impact de substances anti-mélanomes à la fois sur les cellules tumorales et sur cette sous-population. La dacarbazine et le témozolomide ont été utilisés comme chimiothérapie de référence contre le mélanome métastatique et le vemurafenib a été utilisé comme exemple des thérapies de nouvelle génération dans cette même pathologie. Des approches *in vivo* et *in vitro* ont ainsi été menées pour mettre en évidence une réponse différentielle de la sous-population exprimant ABCB5 par rapport à la population tumorale totale face à ces agents de chimiothérapie anti-mélanome. Le concept a ensuite été élargi à une gamme plus importante d'agents cytotoxiques classiquement utilisés dans des stratégies anti-cancéreuses.

Enfin, le rôle fonctionnel d'ABCB5 a été abordé afin d'ouvrir des pistes de réflexion sur l'implication de ce transporteur dans le phénotype observé.

RESULTATS

MODELISATION DE LA RESISTANCE DANS DES MODELES *IN VITRO* DE MELANOMES

Afin de comprendre les mécanismes de la résistance du mélanome, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la modélisation *in vitro* de cette résistance à l'échelle de l'ensemble de la population cellulaire de lignées de mélanome dans différentes conditions de culture.

1 PRESENTATION DES DIFFERENTS MODELES *IN VITRO* DE MELANOME

1.1 Description du panel de lignées de mélanome

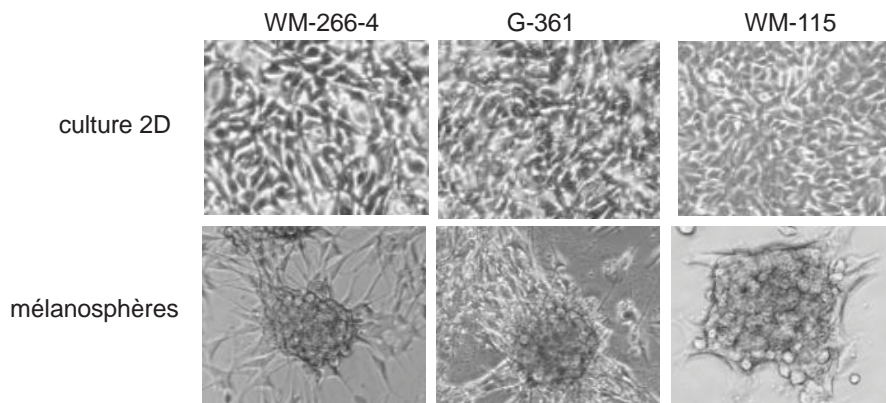
Le panel de lignées de mélanomes utilisé pour cette étude comprend les lignées WM-226-4, WM-115, G-361, SK-MEL-28, A-375, SK-MEL-2 et SK-MEL-5. Les lignées WM-226-4, G-361, SK-MEL-28, A-375, SK-MEL-2 et SK-MEL-5 sont issues de mélanomes métastatiques. La lignée WM-115 quant à elle provient d'un mélanome primaire.

Ces lignées présentent en outre des différences caractéristiques. Seules les lignées SK-MEL-28 et G-361 sont connues pour être pigmentées. La lignée SK-MEL-28 est mutée pour p53 (Haluska et al. 2006) alors que les lignées A-375, WM-115 et G-361 expriment la forme sauvage de la protéine p53. Le statut p53 des autres lignées n'est pas connu. Les lignées WM-226-4, WM-115, G-361, A-375 et SK-MEL-28 expriment également une version mutée V600E de BRAF (résultats non montrés de l'équipe ; Haluska et al. 2006). Le statut BRAF des autres lignées n'est pas connu.

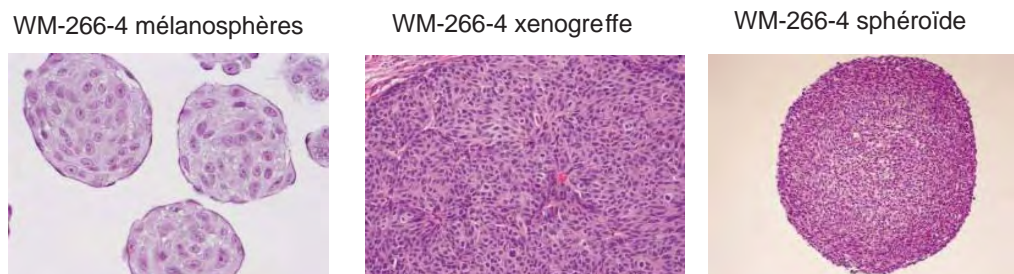
1.2 Description du modèle mélanosphères

Un modèle alternatif de culture en trois dimensions a également été mis en place au sein de l'équipe avant mon arrivée. Ce modèle a été nommé mélanosphère en référence à des structures similaires développées dans d'autres types tumoraux tels que les mammosphères

A.



B.



C.

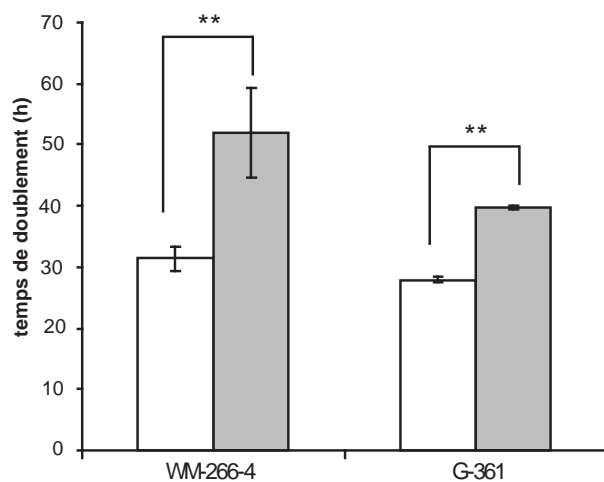


Figure 31 : Description du modèle des mélanosphères

A. Les cellules WM-266-4 ont été cultivées en conditions adhérentes classiques (ligne du haut) ou en mélanosphères (ligne du bas) pour les lignées WM-266-4 (colonne de gauche), G-361 (colonne du milieu) et WM-115 (colonne de droite). Les images ont été prises en microscopie à contraste de phase.

B. Les cellules WM-266-4 ont été cultivées en mélanosphère, en xénogreffe chez la souris Swiss nude ou en sphéroïdes et analysées en coloration éosine-hémalin par immunohistochimie. Les mélanosphères ont été photographiées à un grossissement 40x (image de gauche), la xénogreffe à un grossissement 20x (image du milieu) et le sphéroïde à un grossissement 10x (image de droite).

C. Les cellules triées ont été cultivées en conditions adhérentes classiques ou en mélanosphères pour les lignées WM-266-4 et G-361 et analysée en courbe de croissance. Le temps de doublement est reporté sur le graphique.

pour les cancers du sein, les colosphères pour les cancers du colon ou les neurosphères pour les cancers cérébraux.

Ce modèle de mélanosphères présente une structure en trois dimensions évoluant spontanément en culture dans des modalités de culture propres (figure 31 A.). Ces conditions de cultures requièrent une densité d'ensemencement particulière ainsi que le maintien des cellules dans un milieu de culture spécifique. Ce modèle est à mettre en opposition avec le modèle des sphéroïdes obtenu de façon artificielle en bloquant mécaniquement l'adhésion des cellules par des artifices de culture comme la technique de l'agar mou ou de la goutte. Les mélanosphères sont des structures beaucoup plus petites que les sphéroïdes (diamètre moyen des mélanosphères d'environ 100µm et d'environ 400 à 800µm pour les sphéroïdes) et présentent une organisation structurale différente comme le montre les coupes d'immunohistochimie (figure 31 B.). On retrouve notamment pour les sphéroïdes la formation d'un cœur nécrotique et une prolifération plus importante à la périphérie de la structure.

Sur les 5 lignées de mélanomes testées (WM-266-4, WM-115, G-361, A-375 et SK-MEL-28), seules trois d'entre elles sont capables de former des mélanosphères. La lignée A-375 est ainsi incapable de former de telles structures et la lignée SK-MEL-28 permet la formation de structures intermédiaires par rapport à la culture adhérente mais ne parvient jamais au stade de sphères. La suite de l'étude a donc été menée sur les trois lignées WM-266-4, WM-155 et G-361 formant des mélanosphères.

La formation des mélanosphères débute environ 3 jours après le changement de milieu et les mélanosphères arrivent à maturation (sphères formées encore attachées au support de culture) aux alentours du 5^{ème} jour. Les mélanosphères commencent ensuite à se détacher du support de culture à partir du 10^{ème} jour et continuent leur croissance par allongement unidirectionnel de la sphère initiale (données non montrées). Il convient de noter que la formation de ces structures entraîne une diminution de la prolifération des cellules par rapport à des conditions de culture adhérentes classiques (figure 31 C.). La formation des mélanosphères est un événement réversible puisqu'une remise en milieu de culture classique entraîne un étalement de ces structures sur le support de culture (données non montrées).

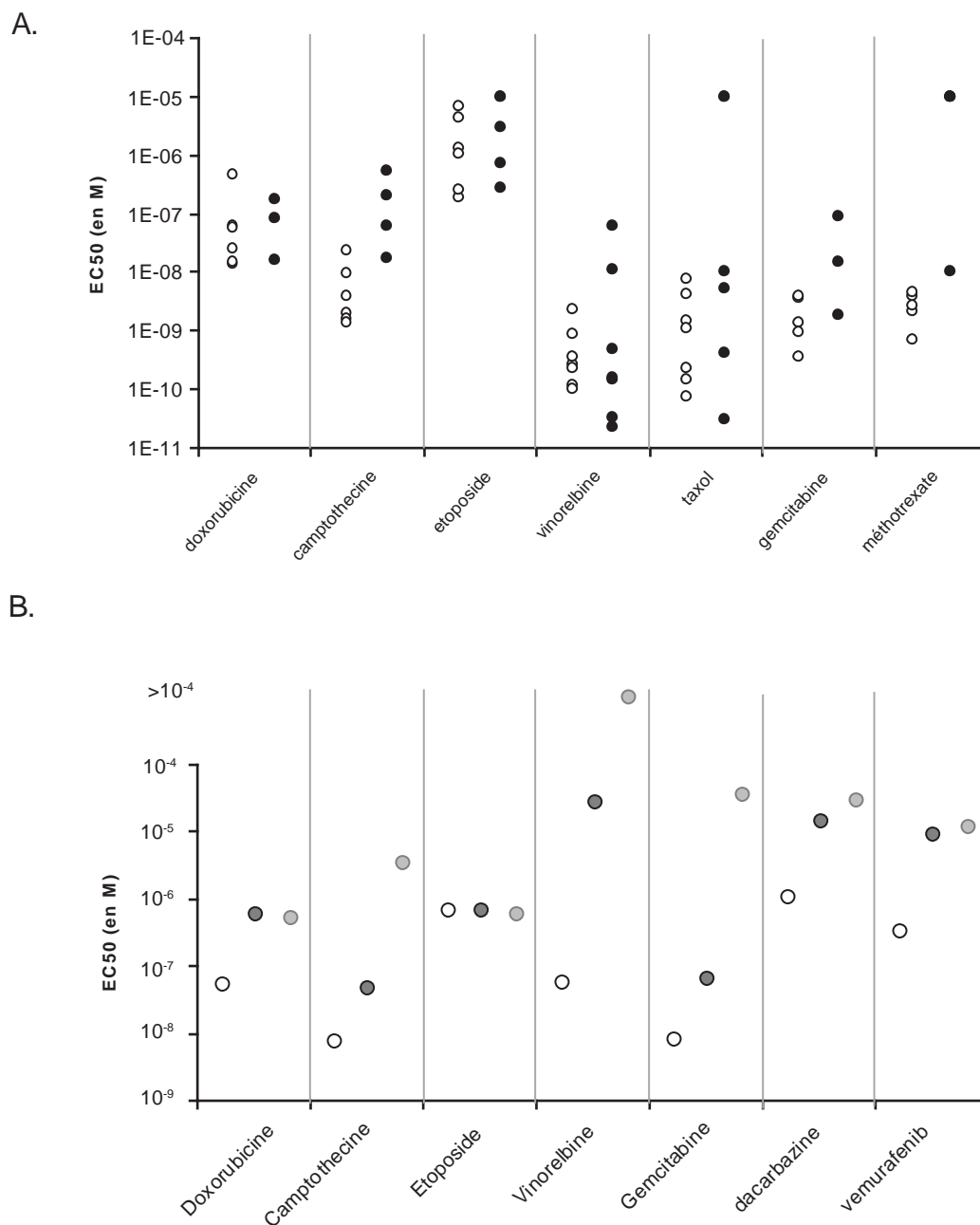


Figure 32 : Modélisation de la chimiorésistance par des modèles in vitro de mélanome

A. Les EC_{50} des agents anti-cancéreux indiqués sont reportées pour un panel de lignées de mélanome (points blancs) et de lignées cancéreuses non mélanome (points noirs).

Le panel non mélanome comprend la lignée A-549 provenant d'un adénocarcinome pulmonaire, la lignée BxCP3 provenant d'un cancer du pancréas, la lignée HCT116 provenant d'un carcinome du colon, la lignée Lovo provenant d'un adénocarcinome du colon, la lignée Hela provenant d'un cancer du col de l'utérus, la lignée SKOV3 provenant d'un adénocarcinome des ovaires et les lignées KB et KB-V1 provenant d'un cancer du col de l'utérus et toutes deux dérivées de la lignée Hela et ayant, pour la lignée KB-V1, été sélectionnée pour sa résistance à la vinblastine (Shen et al. 1986).

B. Les cellules WM-266-4 ont été cultivées en monocouche (points blancs), en mélanosphères (points gris clairs) ou en sphéroïdes (points gris foncés) et traitées par plusieurs agents anti-cancéreux. L' EC_{50} de chaque modèle est reportée par substance.

2 CARACTERISATION DE LA RESISTANCE GLOBALE DES DIFFERENTS MODELES *IN VITRO* DE MELANOME

2.1 Les lignées de mélanomes in vitro ne reflètent pas la chimiorésistance du mélanome

Le mélanome métastatique est particulièrement résistant à la chimiothérapie par rapport à d'autres types de pathologies cancéreuses. Au sein de l'équipe, une étude comparative de la sensibilité à différents agents pharmacologiques a donc été réalisée entre le panel de lignées mélanomes et un panel de lignées cancéreuses non mélanome.

La chimiosensibilité des lignées mélanomes et non mélanomes a ainsi été analysée en réponse à un panel d'agents anti-cancéreux au sein de l'équipe par une technique de dosage de la production d'ATP. L'analyse des résultats en terme d'IC₅₀ montre que pour les lignées étudiées, aucune différence n'est visualisable entre les lignées mélanomes et non mélanomes en terme de sensibilité aux agents pharmacologiques étudiés (figure 32 A.). On peut même noter que pour la réponse à la vinorelbine, les lignées de mélanomes semblent plus sensibles que les lignées non mélanomes.

L'analyse de la sensibilité de ces lignées de mélanome dans des conditions de culture classique (adhérents) ne permet donc pas de rendre compte de la différence de chimiorésistance existant entre le mélanome métastatique et d'autres types de pathologies cancéreuses.

2.2 Le modèle des mélanosphères est plus représentatif de la chimiorésistance du mélanome métastatique que les cellules en monocouche

Comme nous venons de le voir, les lignées cellulaires de mélanome en culture ne sont pas particulièrement résistantes aux agents anti-cancéreux alors que la chimiorésistance est bien réelle en clinique. Dans cette optique, j'ai caractérisé le modèle des mélanosphères en terme de résistance en postulant que leurs caractéristiques de structures tridimensionnelles pouvaient leur conférer une résistance particulière par rapport aux mêmes lignées cultivées de façon adhérente. Cela est en effet le cas pour les sphéroïdes de lignées de mélanome qui présentent une chimiorésistance plus importante attribuée à des problèmes de diffusion des

agents anti-cancéreux au sein de ces structures mimant ainsi les conditions d'absence de vascularisation des tumeurs cancéreuses chez les patients.

Une étude comparative de la sensibilité des différents modèles à des agents anti-cancéreux classiquement utilisés en chimiothérapie a donc été menée par dosage de la production d'ATP. La cytotoxicité de différents agents a été étudiée sur les cellules WM-266-4 cultivées en monocouche, en sphéroïdes ou en mélanosphères. Les différences d'IC₅₀ entre les trois modèles sont indiquées pour chaque substance cytotoxique dans la figure 32 B.. Une différence est quasi systématiquement visualisée entre le modèle adhérent et les deux modèles de sphères (mélanosphères et sphéroïdes) sauf dans le cas de l'étoposide pour lequel les trois modèles présentent une sensibilité équivalente. Une des hypothèses avancées pour expliquer cette différence de sensibilité fait état du manque d'accessibilité des composés au sein d'une structure en trois dimensions. Dans le cas de certains composés (camptothecine, vinorelbine, et gemcitabine), les mélanosphères sont largement plus résistantes que leur équivalent sphéroïdes. Pour les autres composés, la résistance de ces deux modèles est équivalente. Pourtant les sphéroïdes sont des structures beaucoup plus volumineuses que les mélanosphères et on s'attendrait donc à une résistance plus importante des sphéroïdes. Les mélanosphères pourraient donc posséder d'autres caractéristiques de résistance que leur structure en trois dimensions.

Le modèle des mélanosphères apparaît donc plus résistant que leur équivalent en culture adhérente et parfois même plus résistant que leur équivalent sphéroïde. Ces structures semblent donc plus représentatives de la composante chimiorésistante du mélanome.

3 CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC DANS LES DIFFERENTS MODELES *IN VITRO* DE MELANOME

Nous avons détaillé plus haut que les transporteurs ABC sont classiquement impliqués dans la chimiorésistance des cancers. Certains d'entre eux ont notamment été étudié dans le cas du mélanome. Le niveau d'expression de plusieurs transporteurs ABC connus pour leur capacité à effluer des agents anti-cancéreux a donc été caractérisé.

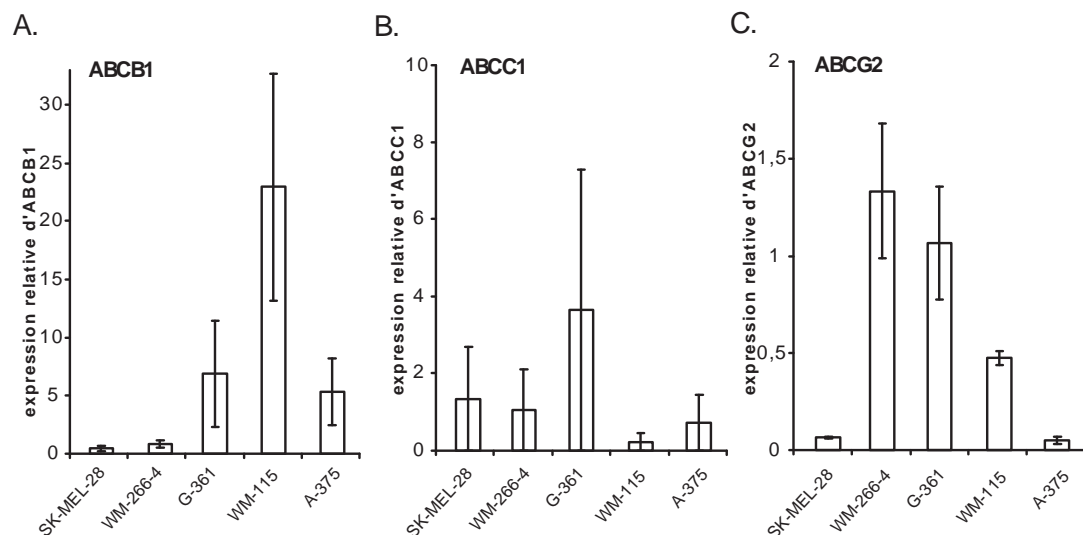


Figure 33 : Caractérisation de l'expression des transporteurs ABC dans le panel de lignées de mélanomes

A., B. et C. Les cellules issues de différentes lignées de mélanomes cultivées en monocouche ont été analysées en PCR quantitative en temps réel pour l'expression des transporteurs classiquement impliqués dans la chimiorésistance des cancers : ABCB1 (A.), ABCC1 (B.) et ABCG2 (C.). L'expression relative a été normalisée par les gènes de ménages HMBS et RPLP0 et l'expression de la lignée WM-266-4 a été arbitrairement fixé à 1.

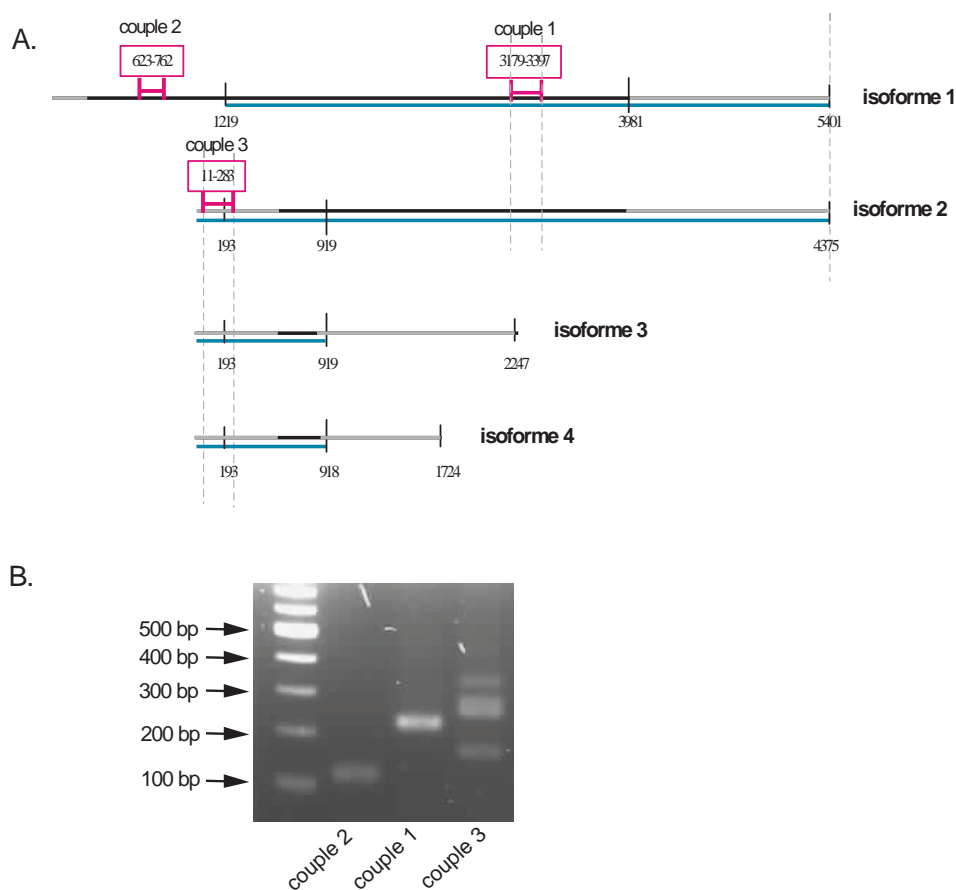


Figure 34 : Mise en place d'un system d'analyse des différentes isoforme du transporteur ABCB5

A. L'alignement des quatre isoformes potentiellement traduites d'ABCB5 est donné dans le schéma. Les séquences identiques sont soulignées en bleu. La position des trois couples d'amorces utilisés et les positions du début et de fin des fragments amplifiés sont indiquées par les encarts rouges

B. Les fragments amplifiés à partir de cDNA de la lignée de mélanome WM-266-4 par chaque couple d'amorces ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. La taille du fragment attendu pour le couple 2 (isoforme 1) est de 139 bp, celui amplifié par le couple 1 est de 218 bp et celui amplifié par le couple 3 est de 272 bp.

3.1 Caractérisation de l'expression des transporteurs ABC dans les lignées de mélanome

Les transporteurs classiquement impliqués dans les phénomènes de résistance des cancers sont les transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2. Le profil d'expression des transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2 a ainsi été étudié dans le panel de lignées de mélanomes par PCR quantitative en temps réel (figure 33 A, B et C.).

Le niveau d'expression d'ABCB1 apparaît très faible pour l'ensemble des lignées étudiées avec des valeurs proches du bruit de fond de la technique de PCR quantitative en temps réel (Ct de 32 cycles pour ABCB1 et bruit de fond à 34 cycles). On peut tout de même noter que la lignée WM-115 issue d'un mélanome primaire exprime de façon reproductible plus d'ABCB1 que les autres lignées toutes issues de mélanomes métastatiques.

L'expression des transporteurs ABCC1 et ABCG2 apparaît beaucoup plus abondante (Ct de 23 et 24 cycles respectivement) avec cependant un manque de reproductibilité pour ABCC1. Les lignées WM-226-4 et G-361 semblent exprimer plus le transporteur ABCG2 que les autres lignées de mélanomes. Aucune corrélation n'a pu être établie entre l'expression des différents transporteurs et la sensibilité aux agents cytotoxiques substrats de ces mêmes transporteurs.

3.2 Caractérisation de l'expression d'ABCB5

Depuis peu, un transporteur encore peu caractérisé a été étudié pour son implication dans la résistance et l'agressivité du mélanome. Le transporteur ABCB5 apparaît ainsi comme un nouvel acteur potentiel de ces phénomènes et nous nous sommes donc intéressés à son expression dans le modèle des lignées de mélanome cultivées en monocouche.

Afin de caractériser l'expression d'ABCB5 au niveau des ARN messagers, un système de détection par PCR quantitative en temps réel a tout d'abord été mis au point. Etant donné l'existence des quatre isoformes d'ABCB5, plusieurs couples d'amorces ont été choisis. J'ai tout d'abord optimisé l'utilisation d'un premier couple d'amorces (couple 1) mis en place au sein de l'équipe avant mon arrivée et permettant de suivre l'expression d'ABCB5 sans discriminer les isoformes 1 et 2. Dans un second temps, j'ai choisi de nouvelles amorces permettant suivant les cas une détection spécifique et distincte de l'isoforme 1 (couple 2) ou une détection des isoformes 2 à 4 (couple 3) étant donné qu'il n'existe aucune séquence spécifique de l'isoforme 2. En effet, cette dernière s'aligne parfaitement avec les isoformes 3

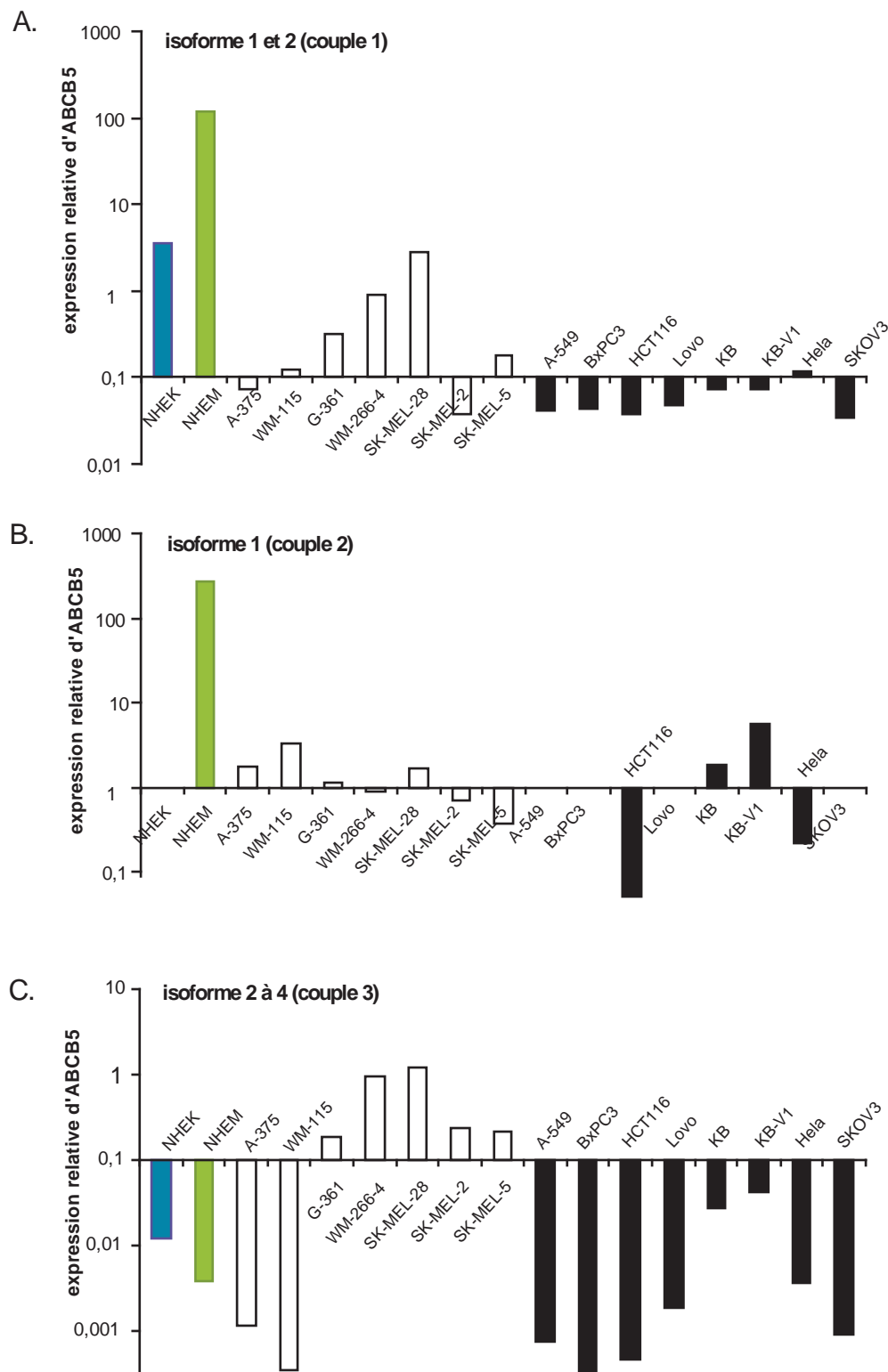


Figure 35 : Le transporteur ABCB5 est préférentiellement exprimé dans les mélanocytes et mélanomes

L'expression relative d'ABCB5 a été analysée par PCR quantitative en temps réel par les différents couples d'amorces sur un panel de lignées cancéreuses de mélanomes (en blanc) et non mélanomes (en noir), ainsi que sur des lignées primaires de kératinocytes sains (en bleu) et de mélanocytes sains (en vert). Le nom de chaque lignée est indiqué. Les valeurs ont été normalisées par rapport aux gènes de ménage HMBS et RPLP0 et la valeur de la lignée WM-266-4 a arbitrairement été fixée à 1.

A. L'expression des isoformes 1 et 2 a été analysée par le couple d'amorce 1.

B. L'expression de l'isoforme 1 a été analysée par le couple d'amorce 2.

C. L'expression des isoformes 2 à 4 a été analysée par le couple d'amorce 3

et 4 ou 1 suivant les régions. Ces couples d'amorces (figure 34 A.) amplifient chacun un fragment à la taille attendue. Des bandes minoritaires supplémentaires sont présentes pour les amorces du couple 3 (figure 34 B.). J'ai donc entrepris une étude de séquençage des produits amplifiés afin de statuer sur la spécificité des amorces utilisées. Le séquençage des produits amplifiés par PCR avec les différents couples d'amorces a été réalisé par la technique de TA-cloning. Les séquences obtenues ont ensuite été alignées grâce au logiciel d'alignement de séquence BLAST avec l'ensemble de la base de données des cDNAs. L'alignement des produits amplifiés par les couples amorces 1 et 2 a bien confirmé que la bande obtenue correspond à ABCB5. Pour le couple d'amorces 3 amplifiant de multiples bandes, l'ensemble des produits obtenus s'aligne avec et seulement avec ABCB5. L'ensemble des amorces est donc spécifique des produits du gène ABCB5.

Plusieurs éléments présents dans la littérature décrivent une expression préférentielle d'ABCB5 dans la lignée mélanocytaire issue de la crête neurale et leurs dérivés cancéreux : le mélanome (Allikmets et al. 1996 ; Taipalensuu et al. 2001; Frank et al. 2003 ; Huang et al. 2004; Szakacs et al. 2004; Chen et al. 2005). Dans ces différentes études, seules les isoformes 2 à 4 avaient été suivies au niveau ARNm. Je me suis donc intéressée à l'expression des différentes isoformes d'ABCB5 dans le panel de lignée de mélanome et dans un panel de lignées cancéreuses non mélanome ainsi que dans des cultures primaires de kératinocytes (NHEK) et de mélanocytes (NHEM) sains humains.

Les produits de l'amplification des isoformes 1 et 2 montrent une expression globalement plus importante d'ABCB5 dans les lignées de mélanomes et les kératinocytes sains et une expression plus forte encore dans les mélanocytes sains (figure 35 A.). L'isoforme 1 est globalement très peu présente avec une détection à la limite de la technique de PCR quantitative en temps réelle (avec des valeurs Ct proches de celles du bruit de fond (Ct de 32 cycles). L'expression de l'isoforme 1 est de plus non spécifique des lignées mélanomes (figure 35 B.) le niveau de détection étant peu différent quelle que soit la provenance de la lignée cancéreuse. Le niveau d'expression de l'isoforme 1 d'ABCB5 est de plus non détectable pour les kératinocytes. Elle est cependant très abondante dans les mélanocytes. Etant donné l'expression ultra-minoritaire de l'isoforme 1 nous en avons déduit que le couple d'amorces amplifiant les isoformes 1 et 2 nous renvoie majoritairement l'expression de l'isoforme 2. Les isoformes 2 à 4 sont quant à elles plus spécifiquement exprimées par les lignées de mélanomes par rapport aux lignées non-mélanome qui expriment peu voire très peu ces isoformes. Elles sont également peu présentes dans les kératinocytes et les mélanocytes sains

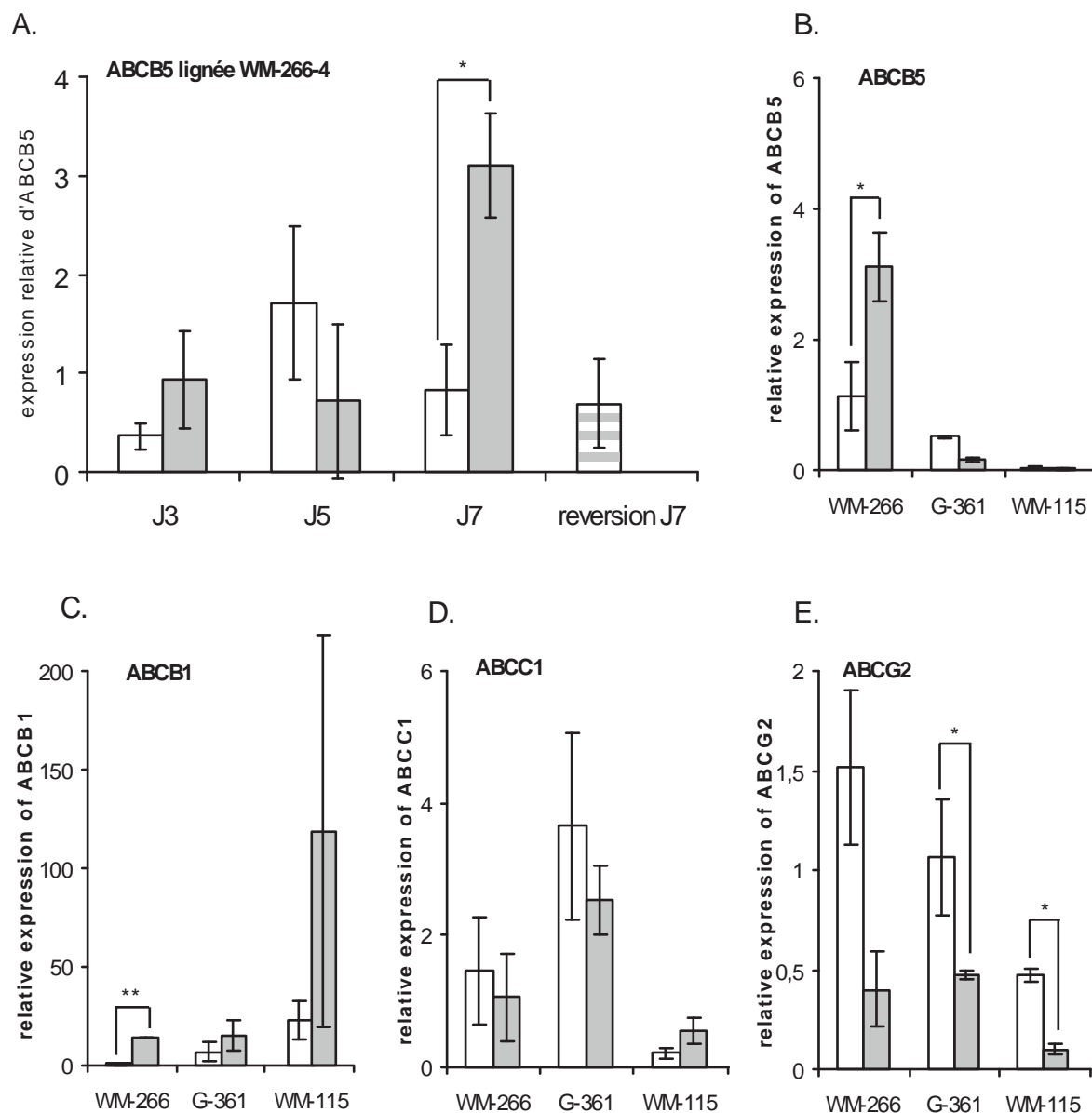


Figure 36 : Caractérisation de l'expression des transporteurs ABC dans le modèle des mélanosphères

A. Les cellules ont été cultivées en monocouche (histogramme blancs) ou en mélanosphères (histogramme gris) et ont été analysées au cours du temps pour leur expression relative en ABCB5 isoforme 1 et 2 (couple d'amorce 1) par PCR quantitative en temps réel.

B., C., D. et E. Les cellules WM-266-4, G-361 et WM-115 ont été cultivées en conditions adhérentes classiques (histogramme blancs), en mélanosphère (histogramme gris) et ont été analysées au 7^{ème} jour pour leur expression relative en ABCB5 (B.), ABCB1 (C.), ABCC1 (D.) et ABCG2 (E.) par PCR quantitative en temps réel.

(figure 35 C.). Il faut également noter que la lignée résistante KB-V1 connue pour exprimer très fortement ABCB1 n'exprime que très peu ABCB5. Ce dernier résultat a par ailleurs été confirmé au niveau protéique (données non montrées).

De façon générale, l'isoforme 1 est donc très présente dans les mélanocytes mais ne permet pas de discriminer les mélanomes des autres pathologies cancéreuses. En revanche, l'isoforme 2 semble particulièrement spécifique des mélanomes par rapport aux autres types tumoraux. L'isoforme 1 serait donc spécifiquement présente dans les mélanocytes sains et l'isoforme 2 dans les mélanomes.

3.3 Caractérisation du modèle des mélanosphères et de l'expression des transporteurs ABC

La sensibilité des lignées de mélanome n'étant pas prédictive de l'expression des transporteurs ABC, nous nous sommes intéressés au modèle des mélanosphères. Les structures de type sphères spontanées ont également été reliées à plusieurs reprises dans la littérature à un enrichissement en cellules initiatrices de tumeurs. Les transporteurs ABCB1, ABCG2 et ABCB5 ont également été étudiés pour leur capacité à marquer ces mêmes cellules initiatrices de tumeur. Ainsi, nous nous sommes demandés si ces structures ne présentaient pas une modification de l'expression de ces transporteurs par rapport à leur équivalent en conditions adhérentes.

L'expression des ARN messagers d'ABCB5 isoformes 1 et 2 (couple 1) a tout d'abord été évaluée par PCR quantitative en temps réel au cours de la cinétique de formation des mélanosphères pour la lignée WM-266-4 (figure 36 A.). Il apparaît que le transcript d'ABCB5 est augmenté de façon significative dans les mélanosphères par rapport à leur équivalent adhérent à partir du 7^{ème} jour. Cette induction varie d'un facteur 2 à 3 suivant les expériences. Il faut noter la légère augmentation visible sur les cellules adhérentes au cours du temps. De plus l'augmentation de l'expression d'ABCB5 est réversible puisque après une remise en conditions de culture monocouche, le ré-étalement des sphères s'accompagne d'un retour à la normale de l'expression d'ABCB5. Les lignées G-361 et WM-115 ont également été étudiées dans les mêmes conditions et aucune différence d'expression d'ABCB5 n'a été visualisée au 7^{ème} jour pour ces deux lignées (figure 36 B.).

L'expression relative des transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2 a également été évaluée dans les trois lignées au 7ème jour par PCR quantitative en temps réel. Une augmentation significative de l'expression d'ABCB1 d'un facteur 8 est visible pour la lignée WM-266-4 et une augmentation du niveau déjà élevé de la lignée WM-115 est également perceptible sans être statistiquement significative (figure 36 C.). L'expression d'ABCC1 ne semble pas différente pour les lignées WM-266-4 et G-361 entre les mélanosphères et les cultures adhérentes. Un léger enrichissement est présent pour la lignée WM-115 mais n'est pas statistiquement significatif (figure 36 D.). Enfin, pour toutes les lignées, l'expression du transporteur ABCG2 n'est pas modifiée entre le modèle des mélanosphères et la culture en conditions adhérentes (figure 36 E.).

La formation de mélanosphères s'accompagne donc pour la lignée WM-266-4 d'une forte augmentation de l'expression d'ABCB1 et dans une moindre mesure d'ABCB5. Il est nécessaire de relier cette observation à celle de la résistance des mélanosphères à différents composés (camptothecine, vinorelbine et gemcitabine) par rapport aux sphéroïdes. Parmi ces composés, la camptothecine et la vinorelbine sont des substrats identifiés d'ABCB1. Cependant cette observation n'est pas généralisable à tous les composés puisque la doxorubicine est également substrat et les mélanosphères ne présentent pas de résistance particulière à ce composé. Comme pour le modèle des lignées de mélanome cultivées en monocouche, l'expression des transporteurs ABC ne peut pas être directement reliée à la sensibilité aux composés cytotoxiques.

Dans les modèles *in vitro* de mélanome développés dans cette étude, une analyse à l'échelle de la population totale ne nous a pas permis de reproduire la chimiorésistance du mélanome. La sensibilité des différents modèles n'a également pas pu être directement reliée à l'expression de transporteurs ABC. Contrairement à ces modèles, l'hypothèse des cellules CRIM permet une modélisation à l'échelle de sous-populations particulières en termes de résistance et d'agressivité. Dans cette optique, la suite de l'étude s'est concentrée sur l'analyse de la résistance des cellules exprimant ABCB5, transporteur ABC récemment impliqué dans le cadre du mélanome dans le phénotype CRIM.

ABCB5 PERMET DE MARQUER UNE SOUS-POPULATION CELLULAIRE POSSEDANT UN AVANTAGE DE SURVIE FACE A LA CHIMIOOTHERAPIE CLASSIQUE

Dans l'hypothèse des cellules CRIM, le marqueur ABCB5 a récemment été identifié pour sa capacité à former des tumeurs chez l'animal. De plus, en tant que membre de la famille des transporteurs ABC et de par sa grande homologie de séquence avec ABCB1, la protéine ABCB5 a été étudiée pour sa capacité à effluer des substances et à conférer une plus grande résistance à des drogues cytotoxiques. Dans ce chapitre, nous avons fait l'hypothèse que ces propriétés d'efflux (partiellement démontrées dans la littérature au début de mon travail) confèrent aux cellules exprimant ABCB5 un avantage de survie face aux traitements chimio-thérapeutiques utilisés dans le traitement du mélanome. Dans cette optique, nous avons cherché à caractériser la sensibilité des cellules exprimant ABCB5 à la dacarbazine, traitement de référence pour le mélanome métastatique ainsi qu'au temozolomide également utilisé en clinique. Nous avons également évalué des molécules de nouvelle génération développées très récemment et montrant des résultats très encourageant au cours des essais cliniques. Ainsi, la résistance des cellules exprimant ABCB5 au vemurafenib, ciblant la kinase BRAF très fréquemment mutée dans le mélanome, a également été étudiée.

1 ABCB5 EST EXPRIME A LA SURFACE D'UNE SOUS-POPULATION DES LIGNEES DE MELANOMES

L'hypothèse des cellules CRIM se base sur l'existence de sous-populations cellulaires distinctes présentant des caractéristiques particulière en termes de résistance et d'agressivité tumorale. Ayant été décrit comme marqueur de cellules CRIM, nous avons décidé de caractériser l'expression de la protéine ABCB5 au sein d'une population de cellules de mélanome.

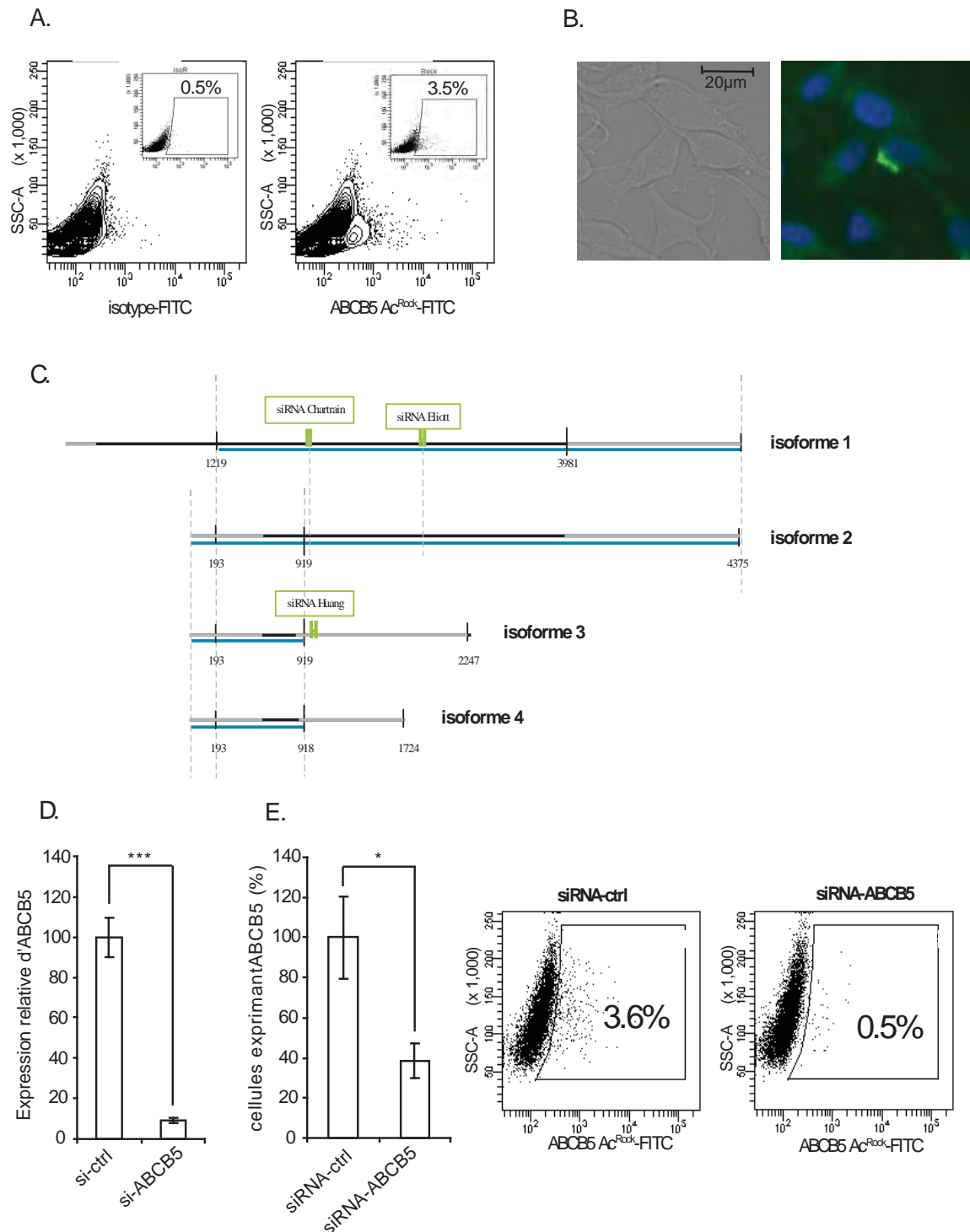


Figure 37 : Le transporteur ABCB5 est exprimé à la surface d'une sous-population des cellules de mélanome

A. Les cellules WM-266-4 ont été marquées en membranaire par un isotype contrôle (dot-plot de gauche) ou un anticorps anti-ABCB5 (AC^{Rockland}) (dot-plot de droite) et analysées par cytométrie en flux sur la population des cellules vivantes (DAPI négatives). Le pourcentage de cellules marquées est indiqué.

B. Les cellules WM-266-4 ont été marquées en membranaire avec l'anticorps AC^{Rockland} et analysées en DIC (pour Contrast interférentiel différentiel) (image de gauche) et en immunofluorescence avec le marquage DAPI en bleu et le marquage par l' AC^{Rockland} en vert (image de gauche).

C. L'alignement des quatre isoformes d'ABCB5 est donné dans le schéma. Les séquences identiques sont soulignées en bleu. La position des siRNA décrits est indiquée par les encarts verts (Huang et al. 2004 et Elliott et al. 2009).

D. Les cellules WM-266-4 ont été transfectées par des siRNA ABCB5 (siRNA Chartrain) ou contrôles et l'expression relative d'ABCB5 a été analysée par PCR quantitative en temps réel 72h après transfection.

E. Les cellules WM-266-4 ont été transfectées par des siRNA ABCB5 (siRNA Chartrain) ou contrôles et l'expression d'ABCB5 a été analysée par cytométrie en flux 72h après transfection. Le pourcentage de cellules marquées est indiqué sur les dot-plots correspondants.

L'expression d'ABCB5 a ainsi été analysée au niveau protéique dans le panel de lignées de mélanomes. Le seul anticorps monoclonal anti-ABCB5 décrit dans la littérature (clone 3C2-1D12, Frank et al. 2003; Frank et al. 2005) n'étant pas disponible au commencement de ce travail, j'ai testé par cytométrie en flux tous les anticorps commerciaux proposés à l'époque. J'ai retenu l'anticorps commercialisé par la société Rockland que nous nommerons Ac^{Rockland}. Il s'agit d'un anticorps polyclonal de lapin dont l'épitope n'est pas connu.

Des expériences de marquage membranaire de la lignée de mélanome WM-266-4 avec l'anticorps AC^{Rockland} et l'analyse par cytométrie en flux ont été optimisés et ont finalement permis de montrer une expression d'ABCB5 au niveau d'une sous-population minoritaire représentant environ 3 % des cellules (figure 37 A.). Le pourcentage de cellules positives est faible mais hautement reproductible. De plus, le marquage ABCB5 sous la forme d'une sous-population est tout à fait cohérent avec la littérature puisque cette observation avait déjà été décrite (Frank et al. 2003; Frank et al. 2005 ; Keshet et al. 2008; Schatton et al. 2008 ; Fukunaga-Kalabis et al. 2010).

Afin de valider la spécificité du marquage par cet anticorps, j'ai mis au point un système d'extinction par siRNA. Des siRNA ciblant ABCB5 avaient déjà été publiés par deux équipes différentes. Pour la première étude, il est apparu après alignement des séquences que les siRNA utilisés ciblaient spécifiquement l'isoforme 3 mais pas les isoformes 1 et 2 (Huang et al. 2004). Pour notre étude, nous avons choisi des siRNA ciblant les isoformes 1 et 2. Six couples de siRNA ont donc été testés dont cinq permettant l'extinction des isoformes 1 et 2 de façon indifférenciée et un permettant d'éteindre les quatre isoformes (figure 37 C). Ultérieurement, d'autres séquences ont été décrites dans la littérature pour cibler les isoformes 1 et 2 (Elliott and Al-Hajj 2009).

J'ai mis au point les conditions expérimentales de transfection en utilisant un siRNA contrôle (luciférase) couplé à la rhodamine dans les lignées WM-226-4 et SKMEL-28 pour suivre l'efficacité de transfection par fluorescence. Une fois les conditions expérimentales de transfection optimisées, j'ai validé les siRNA spécifiques d'ABCB5. Tous les siRNAs ciblant ABCB5 testés montre une extinction spécifique de l'ARNm d'ABCB5 isoforme 1 et 2 (validée par PCR quantitative en temps réel) avec des efficacités relativement similaires (figure 37 D). Pour la suite de l'étude j'ai sélectionné le siRNA n°4. Il faut noter que le siRNA contrôle

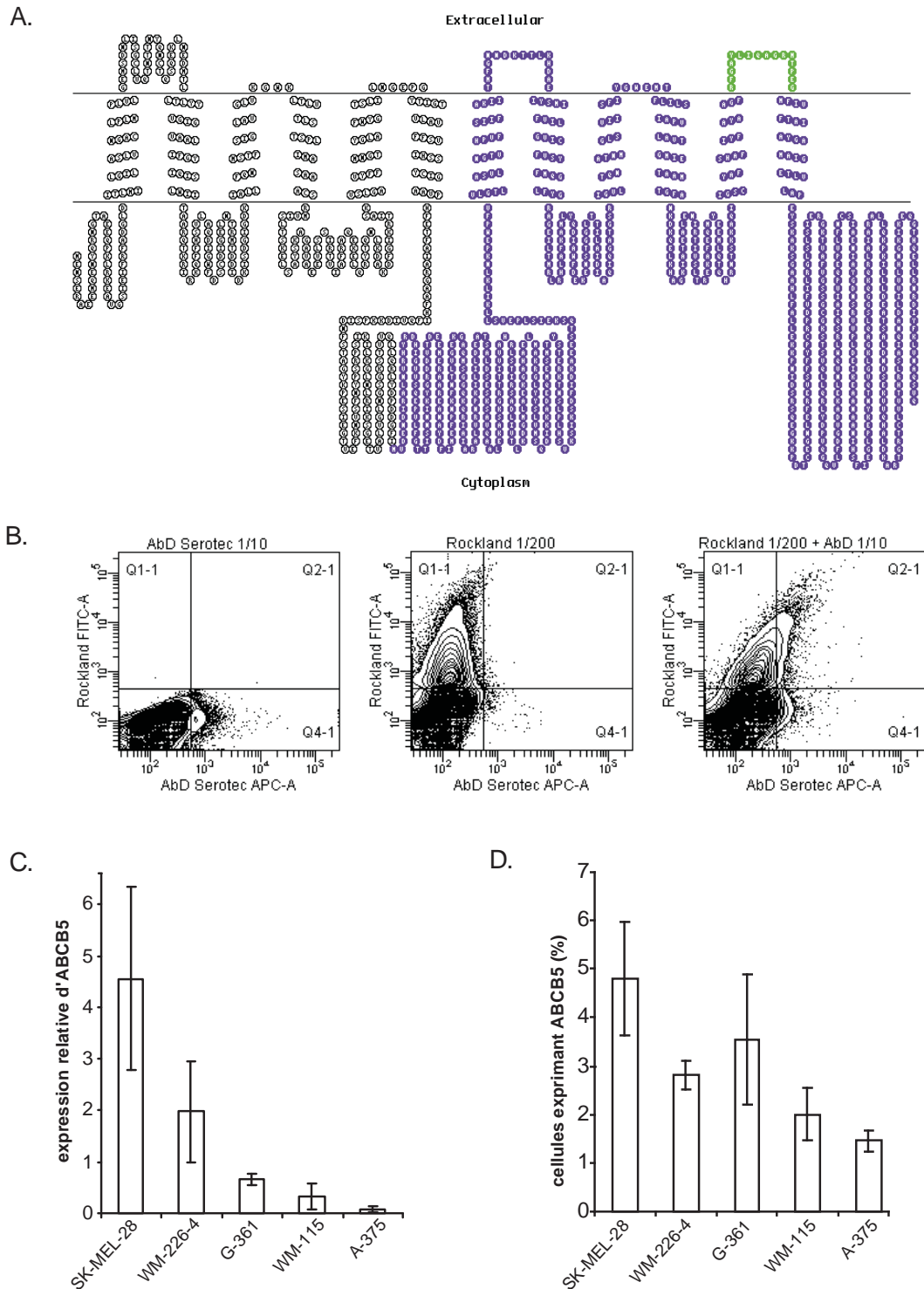


Figure 38 : Le transporteur ABCB5 est exprimé à la surface d'une sous-population des cellules de mélanome (suite)

A. La structure secondaire de l'isoforme 1 d'ABCB5 est représentée. La séquence de l'isoforme 2 est colorée en violet et la séquence de l'épitope de l'anticorps AC^{AbD} est colorée en vert.

B. Les cellules WM-266-4 ont été marquées avec l'anticorps AC^{Rockland} et l'anticorps AC^{AbD} et analysées en cytométrie de flux en simple marquage avec l'anticorps AC^{AbD} (dot plot de gauche), en simple marquage avec l'anticorps AC^{Rockland} (dot plot du centre) ou en co-marquage (dot plot de droite).

C. L'expression relative d'ABCB5 isoformes 1 et 2 (couple d'amorces 1) a été analysée sur le panel de lignée de mélanome par PCR quantitative en temps réel.

D. Le pourcentage de cellules marquées par l'anticorps AC^{Rockland} a été analysé sur le panel de lignée de mélanome par cytométrie en flux.

ciblant la luciférase ainsi que l'agent de transfection seul induit une augmentation de l'expression ARN d'ABCB5 par rapport à la condition non traitée.

La spécificité du marquage obtenu avec l'anticorps Ac^{Rockland} a été validée grâce à ce système d'extinction par siRNA ABCB5. L'extinction n'est pas totale et on la retrouve diminuée de 66% à 72h après transfection (figure 37 E.). Les 33% encore détectés pourraient correspondre soit à un marquage spécifique que les siRNA n'ont pas éteint en raison d'une grande stabilité de la protéine (la demi-vie d'ABCB5 n'est pas connue), soit à du marquage non spécifique de l'anticorps Ac^{Rockland}.

La validation des marquages par cytométrie en flux a permis d'envisager des expériences d'immunofluorescence avec l'anticorps AC^{Rockland} révélées par analyse d'images. Le marquage membranaire est cohérent avec la détection d'une sous-population et pour les cellules positives toute la surface de la cellule n'est pas marquée (figure 37 B.). Le marquage se focalise de préférence dans les prolongations cellulaires et/ou de façon polarisée.

L'anticorps anti-ABCB5 déjà décrit dans la littérature (Frank et al. 2003; Frank et al. 2005) a été commercialisé depuis peu (AbD Serotec) et nous le nommerons Ac^{AbD Serotec}. Il s'agit d'un anticorps monoclonal de souris reconnaissant un épitope extracellulaire (figure 38 A.). Cet anticorps marque une sous-population cellulaire présentant des propriétés initiatrices de mélanome (Schatten et al. 2008). Il a été validé par Western Blot sur un système de sur-expression de la protéine ABCB5 isoforme 2 dans la lignée MCF7 issue d'un cancer du sein et ne présentant pas d'expression d'ABCB5 à l'état basal ainsi que sur la lignée de mélanome G-3361 (Frank et al. 2003).

J'ai utilisé cet anticorps en cytométrie en flux sur la lignée de mélanome WM-266-4. Tout comme pour l'anticorps Ac^{Rockland}, l'anticorps Ac^{AbD Serotec} permet le marquage d'une sous-population dans la lignée WM-226-4. Cette sous-population est tout de même moins abondante que celle marquée par l'anticorps Ac^{Rockland} (0,8% à l'état basal avec l'Ac^{AbD Serotec} contre 3% avec l'Ac^{Rockland}). Un co-marquage entre les deux anticorps permet de montrer que la population positive détectée par le premier anticorps est également reconnue par le second. Ce co-marquage apporte un argument supplémentaire quant à la spécificité de l'anticorps Ac^{Rockland} (figure 38 B.).

Le profil d'expression d'ABCB5 a ensuite été suivi par cytométrie en flux dans le panel de lignées de mélanomes. Comme montré avec la lignée WM-266-4, l'Ac^{Rockland} permet le marquage d'une sous-population minoritaire dans l'ensemble des lignées de mélanomes

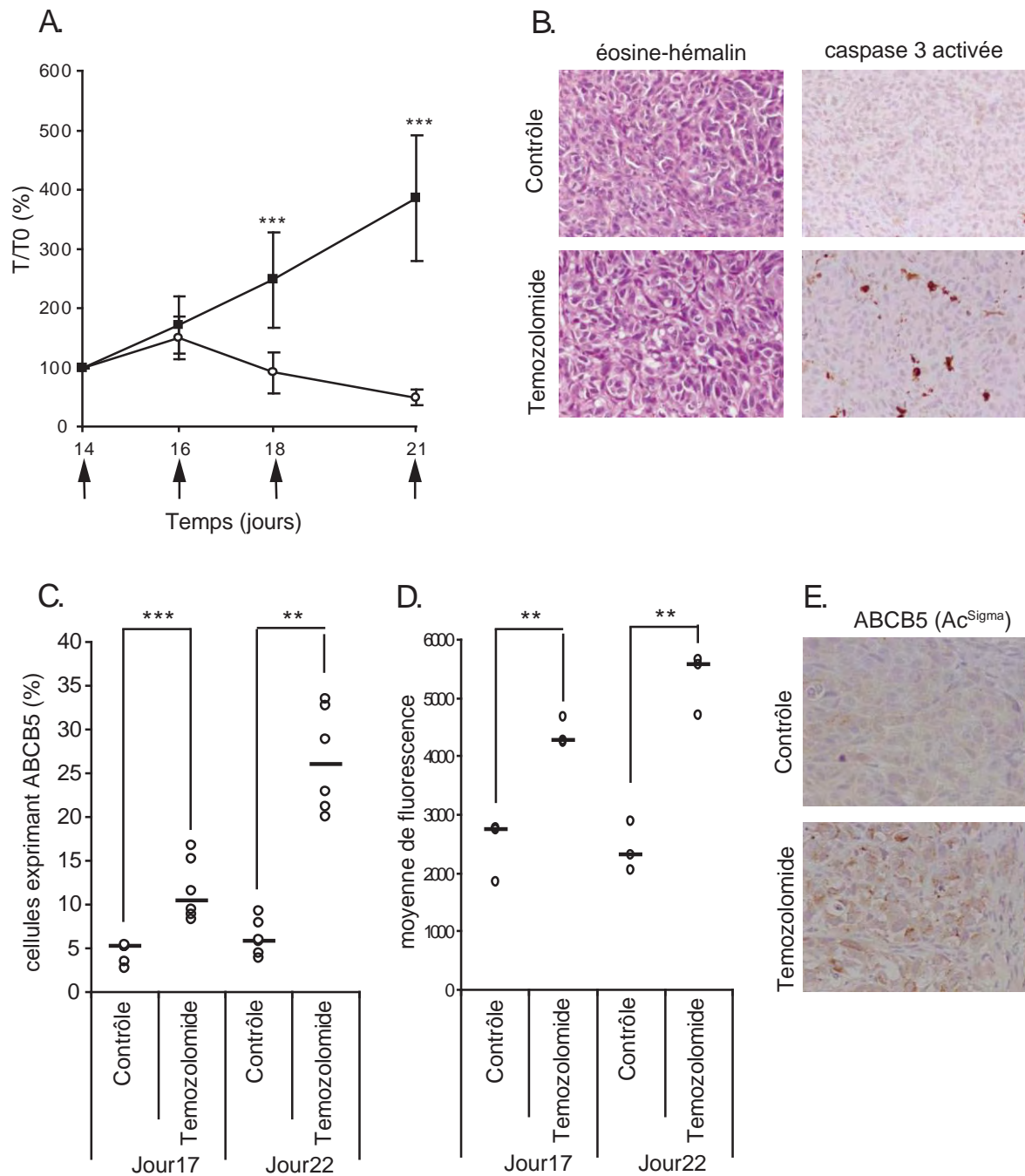


Figure 39 : Le traitement d'une tumeur in vivo par le temozolomide entraîne un enrichissement en cellules exprimant ABCB5

A. Les cellules WM-266-4 (5×10^6 cellules) ont été xénotransplantées chez la souris Swiss nude. Les tumeurs ont été traitées par le temozolomide (80 mg/Kg) ou une substance contrôle suivant le planning indiqué par les flèches noires. L'évolution du volume tumoral a été suivie et rapportée en pourcentage par rapport à la taille des tumeurs à J14.

B. Des tumeurs prélevées à J17 ont été analysées par immunohistochimie en coloration éosine-hémalin ou par marquage de la caspase 3 activée pour rendre compte de l'activité apoptotique (grossissement 40x).

C. et D. A J17 et J22, les tumeurs ont été prélevées et analysées en cytométrie en flux pour l'expression d'ABCB5 Ac^{Rockland}. Le pourcentage de cellules exprimant ABCB5 est reporté pour chaque tumeur (ronds blancs) et les valeurs médianes sont représentées par les lignes noires (C.). La moyenne de fluorescence de la population exprimant ABCB5 est représentée pour chaque tumeur (ronds blancs) et les valeurs médianes sont représentées par les lignes noires.

E. Des tumeurs prélevées à J17 ont été analysées par immunohistochimie pour leur marquage ABCB5 (Ac^{Sigma}) (grossissement 40x).

avec une expression détectée dans 1 à 5 % des cellules suivant les lignées (figure 38 C.). Les lignées A-375 et WM-115 expriment particulièrement peu ABCB5 avec près de 1% de cellules marquées. Les lignées WM-266 et G-361 ont des expressions intermédiaires avec 3% de cellules marquées et la lignée SKMEL-28 apparaît plus fortement marquée avec près de 6% des cellules détectées. J'ai également observé que la proportion de cellules exprimant ABCB5 augmente légèrement avec la confluence des cellules et ce pour toutes les lignées étudiées. Pour toutes les lignées à l'exception de G-361, ce profil correspond à celui observé en ARNm (figure 38 D). La différence observée pour la lignée G-361 peut-être due à une variation de la stabilité des ARNm pour cette lignée ou encore à d'autres éléments de régulation post-transcriptionnels. Il faut noter la différence existant entre les lignées WM-115 et WM-226-4. En effet, ces deux lignées sont issues d'un même patient avec d'une part la tumeur primaire (lignée WM-115) et d'autre part une métastase (lignée WM-266-4).

2 CHEZ LA SOURIS, LE TRAITEMENT D'UNE TUMEUR DE MELANOME PAR LE TEMOZOLOMIDE ENTRAINE UN ENRICHISSEMENT EN CELLULES EXPRIMANT ABCB5

Afin de se rapprocher au mieux des conditions de traitement d'un mélanome en clinique nous avons choisi un modèle *in vivo* de xénogreffe sous-cutanée de cellules de mélanome WM-266-4 sur des souris Swiss-nude. Nous avons étudié la réponse *in vivo* de la sous-population exprimant ABCB5 à un traitement au temozolomide, classiquement utilisé en clinique pour le traitement du mélanome métastatique. Les souris ont été injectées par voie sous-cutanée avec 5 millions de cellules de mélanome WM-266-4. Après 14 jours de croissance tumorale, les souris ont été traitées par injection intra-péritonéale de temozolomide ou d'une substance contrôle (20% DMSO, 5% Tween 80 et 75% glucose 5%) à 80mg/kg trois fois par semaine pendant une semaine et demie (J14, J16, J18 et J21). Le volume tumoral a été suivi au cours du temps. Une réduction significative du volume tumoral après traitement (figure 39 A.) et un suivi de l'apoptose caractérisée par un marquage caspase 3 activée par immunohistochimie à J17 (figure 39 B.) attestent de l'action du temozolomide.

Des souris ont été sacrifiées à mi-traitement et à la fin du traitement et les tumeurs ont été dissociées pour effectuer un suivi des cellules exprimant ABCB5 par cytométrie en

flux. Un co-marquage avec un anticorps anti-CD44_{humain} a permis de s'assurer que seules les cellules humaines de mélanomes étaient analysées pour le marquage d'ABCB5. Les tumeurs traitées au temozolomide présentent un pourcentage de cellules exprimant ABCB5 plus important que les tumeurs non traitées et ce de façon concomitante à la réduction du volume tumoral (figure 39 C.). Cette augmentation du pourcentage de cellules exprimant ABCB5 est d'autant plus grande que le temps de traitement est important (10% à J17 et 25% à J22 en moyenne). De plus, une analyse de la population des cellules positives pour ABCB5 en moyenne de fluorescence nous apprend qu'en plus d'une augmentation du nombre de cellules positives, le traitement au temozolomide induit aussi une augmentation de la moyenne de fluorescence de la population exprimant ABCB5 ce qui signifie que les cellules positives expriment plus de protéine ABCB5 à leur surface après traitement au temozolomide que sans traitement (figure 39 D.). L'expression d'ABCB5 a également été étudiée par la technique d'immunohistochimie avec un anticorps commercial récemment décrit pour cette même technique. Nous nommerons cet anticorps Ac^{Sigma}. Une augmentation du marquage ABCB5 a été visualisée confirmant les observations précédentes (figure 39 E.).

3 *IN VITRO*, UNE AUGMENTATION DU POURCENTAGE DE CELLULES EXPRIMANT ABCB5 EST OBSERVEE APRES TRAITEMENT PAR DIFFERENTS AGENTS DE CHIMIOOTHERAPIE

Afin de pouvoir étudier plus en détail le mécanisme entraînant l'augmentation du pourcentage de cellules exprimant ABCB5 après traitement visualisé *in vivo*, nous avons décidé de travailler sur une lignée de mélanome (lignée WM-226-4) en utilisant la même approche transposée *in vitro*.

3.1 La dacarbazine ainsi que divers agents de chimiothérapie entraînent un enrichissement en cellules exprimant ABCB5 au sein d'une population de cellules de mélanome

Le temozolomide étant une pro-droque, il nécessite une métabolisation pour être actif et n'a donc aucun effet *in vitro*. Par conséquent nous avons choisi d'utiliser la dacarbazine puisqu'elle agit selon le même mécanisme que le temozolomide et qu'elle agit comme le temozolomide utilisé en clinique. Tout comme *in vivo*, un traitement de la lignée WM-266-4

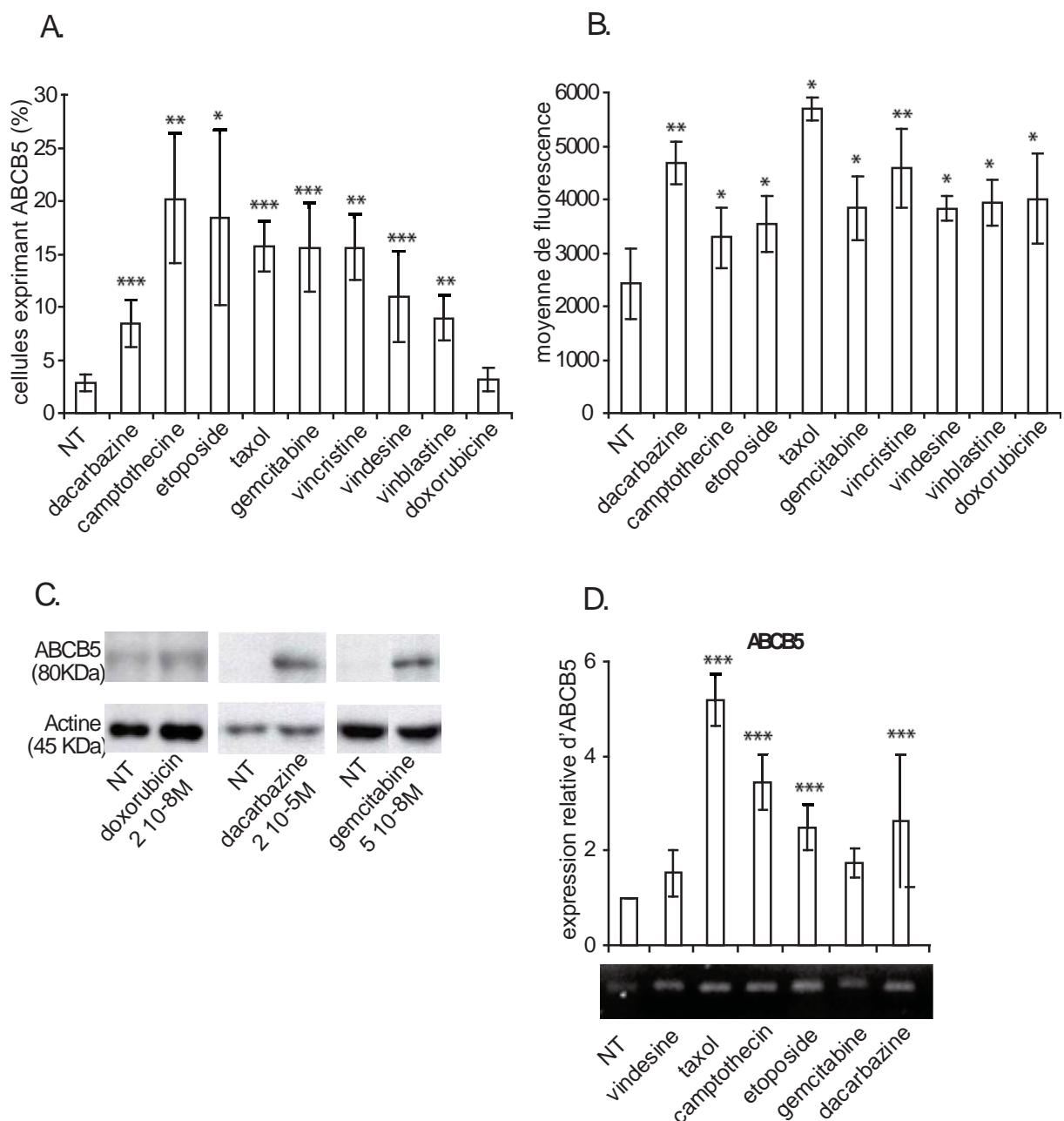


Figure 40 : Le traitement *in vitro* par différents agents chimiothérapeutiques entraîne une augmentation de la sous-population exprimant ABCB5

Les cellules WM-266-4 ont été traitées pendant 72 h à un panel d'agents anti-cancéreux à une concentration proche de l'EC50.

Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux pour leur expression membranaire d'ABCB5.

A. Le pourcentage de cellules exprimant ABCB5 est reporté pour chaque composé.

B. La moyenne de fluorescence de la population exprimant ABCB5 est reportée pour chaque composé.

C. Après extraction membranaire, l'expression d'ABCB5 a été analysée par Western Blot.

D. L'expression relative d'ABCB5 a été analysée par PCR quantitative en temps réel pour chaque composé. Les produits d'amplification ont été analysés par gel d'agarose.

pendant 72h à la dacarbazine à une dose proche de l'IC₅₀ entraîne un enrichissement en cellules exprimant ABCB5, visualisable par cytométrie en flux (figure 40 A.). Cette observation a été généralisée à 8 autres substances chimio-thérapeutiques issues de différentes classes thérapeutiques. La quasi-totalité conduit à la même réponse avec un enrichissement d'un facteur variant de 3 à 9, à l'exception de la doxorubicine dont l'effet n'est pas statistiquement significatif (figure 40 A.). De plus, tout comme pour l'étude *in vivo*, l'analyse de l'intensité de marquage (moyenne de fluorescence) de la population exprimant ABCB5 nous apprend que les différents traitements entraînent une augmentation de la quantité de protéines ABCB5 exprimées à la surface des cellules positives (figure 40 B.). Ceci est également vrai pour la doxorubicine qui pourtant ne permet pas l'augmentation du nombre de cellules positives.

L'effet du traitement sur l'enrichissement en cellules ABCB5 est visualisable dès 48h après le début du traitement et continue d'augmenter jusqu'à 120h après traitement (temps maximum étudié) (données non montrées). Nous avons également montré que ce phénotype ne perdure pas lorsque le traitement est stoppé puisque 72h après l'arrêt d'un traitement ayant duré lui-même 72h, la quasi-totalité de l'enrichissement est perdu (données non montrées).

Cette augmentation du pourcentage du nombre de cellules exprimant ABCB5 a été corrélée à une augmentation de l'expression d'ABCB5 mise en évidence par Western Blot après une extraction des protéines de type membranaire (figure 40 C.). La protéine ABCB5 est difficilement visualisable à l'état basal mais après traitement à la dacarbazine, une bande correspondant à un poids moléculaire apparent de 80 KDa semblable à celui de l'isoforme 2 d'ABCB5 apparaît très nettement. Une bande de 130KDa pouvant correspondre à l'isoforme 1 a été détectée, mais aucune variation après traitement n'a été observée. Ces observations ont également été reproduites pour un autre agent cytotoxique : la gemcitabine permettant un des niveaux d'induction d'ABCB5 le plus important. L'absence d'augmentation avec la doxorubicine a également été vérifiée (figure 40 C.).

Nous nous sommes également demandés si l'augmentation visualisée au niveau protéique avait également lieu au niveau des ARN messagers. Une étude transcriptionnelle a donc été entreprise sur le panel de drogues utilisées précédemment. A l'exception de la gemcitabine, l'ensemble des agents cytotoxiques induisant une augmentation de l'expression d'ABCB5 au niveau protéique l'induisent également au niveau ARNm pour les isoformes 1 et

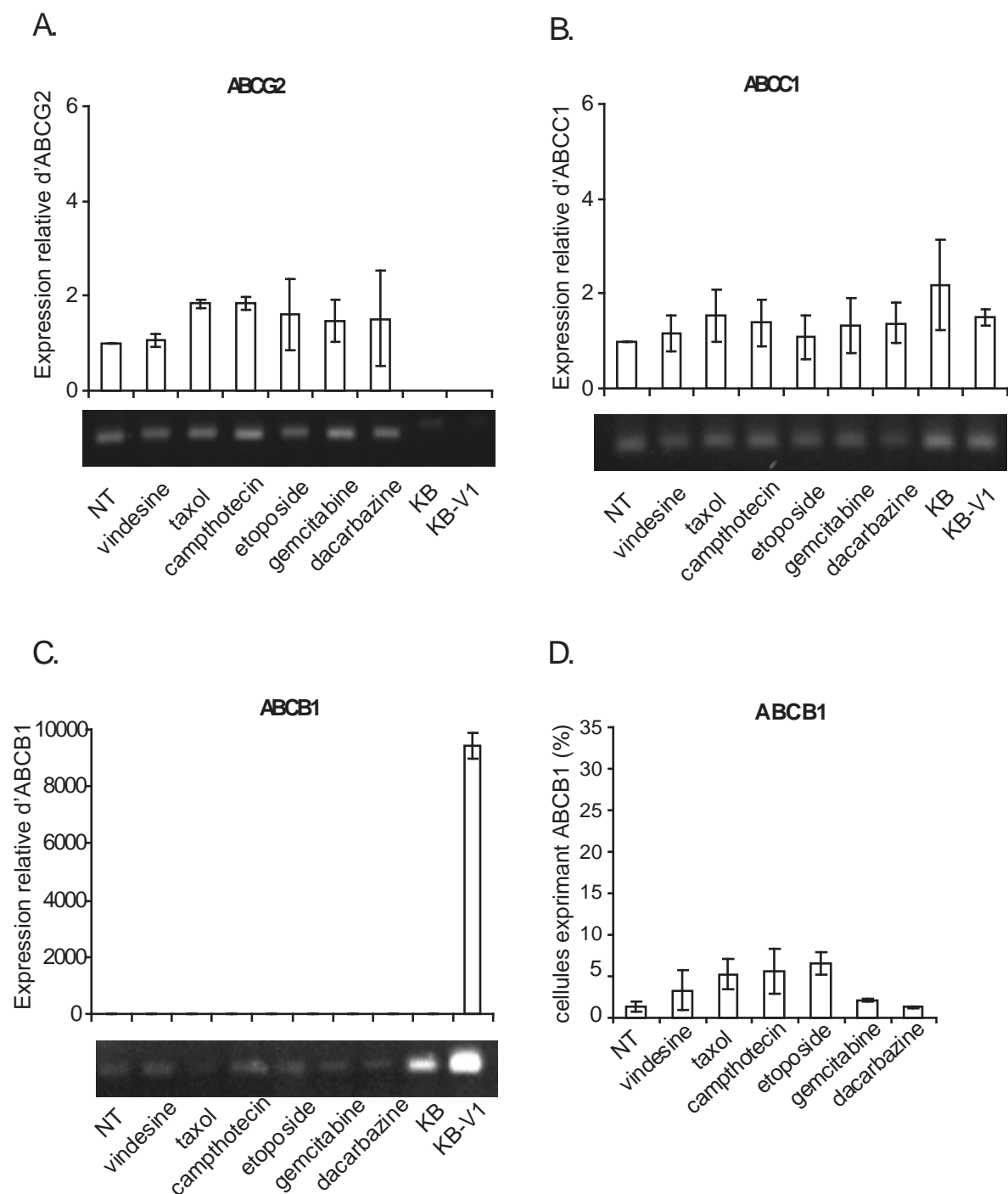


Figure 41 : ABCB5 est le seul transporteur ABC impliqué dans ce phénotype de résistance

Les cellules WM-266-4 ont été traitées pendant 72 h à un panel d'agents anti-cancéreux aux alentours de l'EC50.

A. L'expression relative d'ABCG2 a été analysée par PCR quantitative en temps réel pour chaque composé. Les produits d'amplification ont été analysés par gel d'agarose.

B. L'expression relative d'ABCC1 a été analysée par PCR quantitative en temps réel pour chaque composé. Les produits d'amplification ont été analysés par gel d'agarose.

C. L'expression relative d'ABCB1 a été analysée par PCR quantitative en temps réel pour chaque composé. Les produits d'amplification ont été analysés par gel d'agarose.

D. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux pour leur expression membranaire d'ABCB1. Le pourcentage de cellules exprimant ABCB1 est reporté pour chaque composé.

2 confondues (figure 40 D.). Le niveau de l'isoforme 1 est toujours très minoritaire par rapport à celui de l'isoforme 2. Toutefois, l'isoforme 1 montre une induction sous traitement par rapport à son niveau basal (données non montrées). Cette observation est en accord avec les résultats de Western Blot présentés précédemment. Comme observé au niveau protéique, l'augmentation des ARNm ABCB5 après traitements débute environ 48h après le début du traitement et augmente au cours du temps jusqu'à 120h après traitement (temps maximal observé) (données non montrées).

3.2 ABCB5 est le seul transporteur ABC impliqué dans le phénotype observé.

Plusieurs transporteurs ABC ont été impliqués dans le phénotype « multi-drug resistance » (MDR) et certains comme ABCC1 pourraient jouer un rôle dans la résistance du mélanome (Ichihashi and Kitajima 2001). Les plus caractérisés et les plus étudiés pour ces propriétés sont ABCB1, ABCC1 et ABCG2. Nous avons donc voulu savoir si ces trois transporteurs ont été également induits après traitement dans notre modèle *in vitro*. Pour ce faire, nous avons suivi par PCR quantitative l'expression des trois transporteurs après traitement à un panel de substances chimio-thérapeutiques sur la lignée WM-266-4. L'expression d'ABCG2 n'est pas modifiée suite aux différents traitements (figure 41 A.). De même, ABCC1 pourtant décrit dans certaines études pour participer à la chimiorésistance du mélanome, n'est pas augmenté au niveau ARN messager après traitements (figure 41 B.). Concernant ABCB1, son expression est très faible (à la limite du détectable dans notre système d'étude) dans la lignée WM-266-4 en comparaison de celle des lignées KB et KBV1 souvent utilisées respectivement comme contrôle négatif et positif pour son expression. Cependant et même si cette dernière n'est pas statistiquement significative, une différence est visible après traitements au panel de substances cytotoxiques (figure 41 C.). Une analyse protéique a donc été menée pour infirmer ou confirmer cette tendance. Au niveau protéique, ABCB1 est très faiblement exprimé dans la lignée WM-266-4 ce qui confirme les résultats obtenus en PCR quantitative. Le pourcentage de cellules positives pour ABCB1 varie entre 0,3 et 1% à l'état basal. Après traitement la tendance visible en PCR quantitative est confirmée même si encore une fois les différences entre les échantillons traités et non traités ne sont pas significatives (figure 41 D.). Le pourcentage de cellules positives reste malgré tout très faible en comparaison des cellules exprimant ABCB5 surtout après traitement. En effet les cellules ABCB5 positives sont plus de dix fois plus nombreuses que les cellules ABCB1

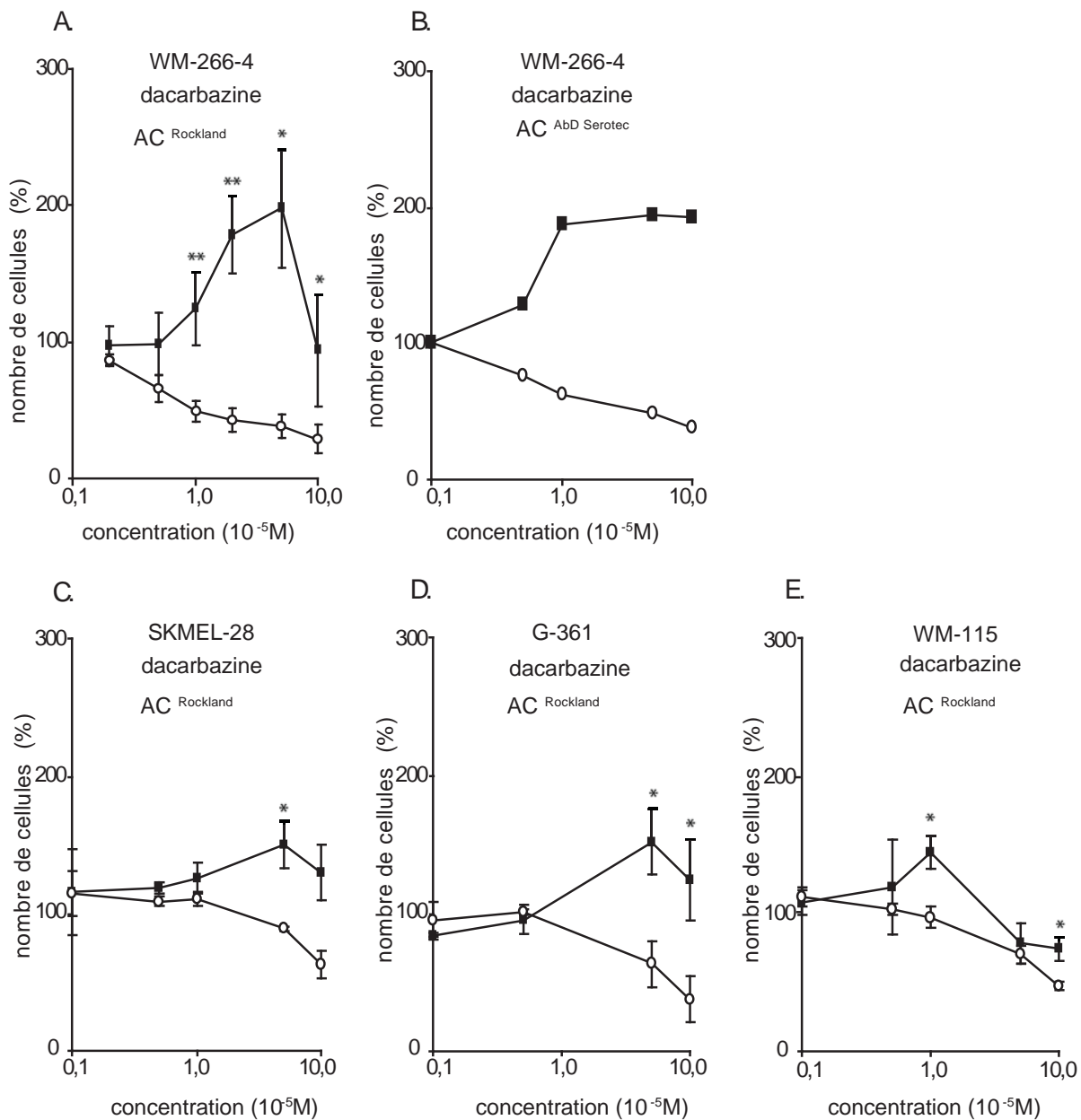


Figure 42 : Le traitement à la dacarbazine entraîne une survie sélective des cellules exprimant ABCB5

A. et B. Les cellules WM-266-4 ont été traitées à la dacarbazine pendant 72h aux doses indiquées. Après 72h de traitement, le nombre total de cellules vivantes a été analysé par exclusion au bleu trypan et le pourcentage de cellules viables exprimant ABCB5 a été analysé par cytométrie en flux après marquage avec les anticorps Ac^{Rockland} (A.) ou Ac^{AbD Serotec} (B.). Le marquage avec l'anticorps Ac^{AbD Serotec} n'a été réalisé qu'une fois. Le nombre total de cellules viables (ronds blancs) sont reportées comme pourcentage par rapport au contrôle non traité. Le nombre de cellules viables exprimant ABCB5 (carrés noirs) a été calculé comme un ratio du nombre de cellules totales et reportées comme pourcentage par rapport au contrôle non traité (les cellules exprimant ABCB5 représentant 3% des cellules totales dans l'échantillon non traité).

C à E. Les cellules SK-MEL-28 (C.), G-361 (D.) et WM-115 (E.) ont été traitées à la dacarbazine pendant 72h aux doses indiquées. La survie de la population totale (ronds blancs) et de la population ABCB5 (carrés noirs) après marquage ABCB5 avec l'anticorps Ac^{Rockland} est indiquée.

positives après traitement ce qui suggère un rôle mineur d'ABCB1 dans le phénotype observé. En conclusion, les transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2 communément impliqués dans la résistance des tumeurs cancéreuses à la chimiothérapie ne semblent pas jouer pour le mélanome un rôle prédominant en regard de celui d'ABCB5.

3.3 Le traitement à des agents anticancéreux de chimiothérapie classique entraîne une survie sélective des cellules exprimant ABCB5

Dans l'optique d'affiner les résultats obtenus sur l'augmentation du pourcentage de cellules exprimant ABCB5 après traitement pharmacologique, une étude en gamme dose-réponse a ensuite été effectuée sur 72h en suivant le nombre absolu de cellules totales et de cellules exprimant ABCB5.

J'ai tout d'abord mis en place une méthodologie permettant de suivre l'évolution de la sous-population des cellules exprimant ABCB5 et de la population tumorale totale au cours d'un traitement par chimiothérapie. En suivant simultanément le nombre et la viabilité de l'ensemble de la population ainsi que le pourcentage de cellules exprimant ABCB5 par marquage avec l'anticorps Ac^{Rockland}, l'évolution de chaque population (population totale et population exprimant ABCB5) peut être quantifiée.

Pour des doses de dacarbazine induisant une cytotoxicité avérée sur l'ensemble de la population des WM-266-4 ($\geq 50\%$), il convient de remarquer que la sous-population exprimant ABCB5 ne suit pas la même évolution que la population totale. En effet, non seulement les cellules exprimant ABCB5 ne meurent pas sous l'effet du traitement, mais de plus le traitement à des doses proches de l'IC₅₀ permet une augmentation du nombre absolu de cette population. Cette observation semble indiquer que les cellules exprimant ABCB5 sont sélectionnées puisqu'elles ne semblent pas subir la cytotoxicité et qu'elles sont de plus induites et/ou stimulées dans leur prolifération en réponse à un traitement à la dacarbazine (figure 42 A.). A des doses plus importantes (entraînant une mortalité de l'ordre de 70% de la population totale), la population exprimant ABCB5 n'est pas augmentée mais sans subir pour autant une cytotoxicité importante. Malgré un niveau de détection plus faible obtenu avec l'anticorps AC^{AbD Serotec}, une augmentation similaire est visualisable en dose-réponse dacarbazine (figure 42 B.).

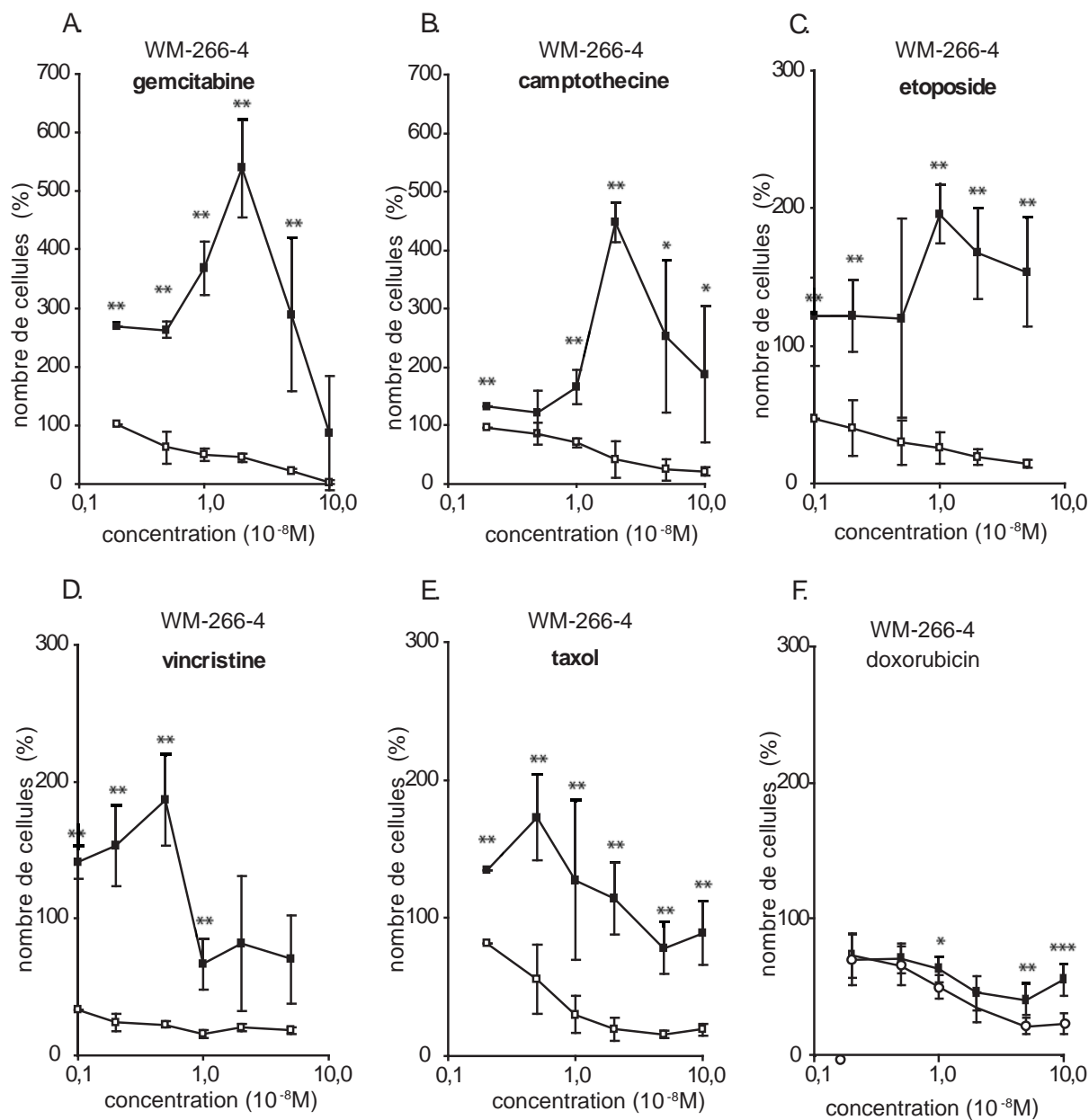


Figure 43 : Le traitement à différents agents anti-cancéreux entraîne une survie sélective des cellules exprimant ABCB5

A. à F. Les cellules WM-266-4 ont été traitées à la gemcitabine (A.), la camptothécine (B.), l'étoposide (C.), la vincristine (D.), le taxol (E.) ou la doxorubicine (F.) pendant 72h aux doses indiquées. La survie de la population totale (carrés blancs) et de la population ABCB5 (carrés noirs) après marquage ABCB5 avec l'anticorps Ac^{Rockland} est indiquée.

Les observations réalisées sur la lignée WM-266-4 ont été reproduites avec deux autres lignées de mélanome : les lignées G-361 et SK-MEL-28 (figure 42 C. et D.). A des doses autour de l'IC₅₀, une augmentation significative mais moins importante que pour la lignée WM-266-4 est observée. A des doses plus importantes une absence d'augmentation voir une légère diminution de la population est cependant notée. Il faut noter que la cytotoxicité observée de la dacarbazine sur ces trois lignées est corrélée au niveau basal d'expression d'ABCB5. En effet, la lignée SK-MEL-28 possédant le plus de cellules exprimant ABCB5 à l'état basal, est la lignée la plus résistante à la dacarbazine (IC₅₀ $\geq 10^{-5}$ M). La lignée G-361 montre un niveau basal d'expression d'ABCB5 intermédiaire ainsi qu'une cytotoxicité intermédiaire (IC₅₀ de $5 \cdot 10^{-6}$ M). Enfin, la lignée WM-266-4 exprimant moins d'ABCB5 au niveau basal est également plus sensible à la dacarbazine (IC₅₀ de $5 \cdot 10^{-7}$ M). De plus, le niveau d'induction est inversement corrélé au niveau basal d'expression. Ainsi la lignée SK-MEL-28 exprime plus fortement ABCB5 que la lignée WM-266-4 à l'état basal et permet une moins forte augmentation du nombre de cellules exprimant ABCB5 que WM-266-4. La lignée WM-115 issue d'une tumeur primaire a également été étudiée. Dans cette lignée, l'augmentation d'ABCB5 semble moins importante et apparaît pour des doses moins cytotoxiques (entre 10 et 20% de cytotoxicité contre des valeurs $\geq 50\%$ pour les autres lignées) (figure 42 E.).

Afin de déterminer si l'augmentation de la population ABCB5 est spécifique de la dacarbazine, des expériences similaires ont été conduites avec un panel de composés cytotoxiques. Toutes les substances étudiées, excepté la doxorubicine, entraînent un maintien voir une augmentation de la population exprimant ABCB5 lorsque la population totale subit l'effet cytotoxique (figure 43).

La gemcitabine ou encore la camptothécine permettent d'augmenter le pourcentage de cellules positives jusqu'à 50% de la population tumorale totale et d'augmenter la population d'un facteur 5 en nombre absolu de cellules (figure 43 A. et B.).

Un traitement au taxol, à l'etoposide ou la vincristine montre une augmentation nettement réduite de la population ABCB5 voir dans certains cas un maintien de la population sans augmentation. Cette réponse intermédiaire est visualisable avec une augmentation d'un facteur 1,5 à 2 en nombre absolu de cellules soit environ 15 à 20% de cellules exprimant ABCB5 (figure 43 C., D. et E.).

Dans le cas de la doxorubicine qui n'avait pas montré d'augmentation du pourcentage de cellules positive pour ABCB5 à l'IC₅₀, le suivi du nombre absolu des cellules ABCB5

Patient	Prélèvement		Avant traitement	Après traitement	Cellules exprimant ABCB5 (%)
1	12/05/2009	nodule		X	90
2	18/08/2010	métastase dermique	X		2
3	09/09/2010	nodule hypodermique	X		24
4	26/10/2009	nodule hypodermique		X	88
	02/03/2010	nodule hypodermique		X	80
5	11/12/2006	métastase cutanée	X		24
6	13/03/2009	métastase dermique	X		8
	19/05/2009	métastase dermique	X		16
	24/02/2011	nodule de perméation		X	23
	23/03/2011	métastase dermique		X	19
7	29/10/2010	nodule de perméation	X		12
	12/11/2010	nodule de perméation	X		17
	22/04/2011	métastase		X	6
8	05/01/2010	nodule de perméation	X		22
	13/04/2011	nodule sous-cutané		X	2

Tableau 13 : Description des prélèvements de patients

Pour chaque patient, le type et date des prélèvements sont indiqués. Il est également mentionné l'état de traitement du patient au jour du prélèvement. Les résultats du marquage ABCB5 (Ac^{Sigma}) sont donnés sous la forme du pourcentage de cellules marquées au sein de la tumeur.

Patient	Traitements			
1	DETICENE	6 cures en 2006		
	IPILIMUMAB	sept-06		
2	DETICENE	03/09/2010	12/10/2010	09/11/2010
		08/12/2010	05/01/2011	02/02/2011
		02/03/2011	30/03/2011	27/04/2011
3	INTERFERON	02/10/2008	01/03/2010	
	DETICENE	06/01/2011	02/02/2011	02/03/2011
4	INTERFERON	19/02/2008		
	DETICENE	03/09/2008	23/09/2008	20/10/2008
		31/03/2010	28/04/2010	27/05/2010
	MUPHORAN	24/06/2010	01/07/2010	28/07/2010
		01/09/2010		
	IPILIMUMAB	20/10/2010	10/11/2010	01/12/2010
5				
6	DETICENE	19/01/2011	23/02/2011	23/03/2011
	IPILIMUMAB	25/05/2011		
7	DETICENE	25/11/2010	18/12/2010	12/01/2011
		09/02/2011	16/03/2011	
8	DETICENE	17/03/2010	08/04/2010	29/04/2010

Tableau 14 : Historique de traitement des patients

Pour chaque patient, le type et date des traitements suivis sont indiqués. On retrouve pour tous les patients un traitement au déticene (dacarbazine) qui dans certains a été précédé par un traitement à l'interféron et/ou suivi par des traitements au muphoran (fotemustine) ou à l'ipilimumab.

montre effectivement que la population ABCB5 réagit différemment. La population ABCB5 subit en effet l'effet cytotoxique de la doxorubicine de façon relativement équivalente à la population totale (figure 43 F.). Une différence significative est tout de même notable pour des doses élevées (correspondant à 70-80% de mortalité pour la population totale) ce qui pourrait correspondre à une sélection de la population à ces doses.

4 ETUDE PRELIMINAIRE SUR DES ECHANTILLONS CLINIQUES

4.1 Description des patients

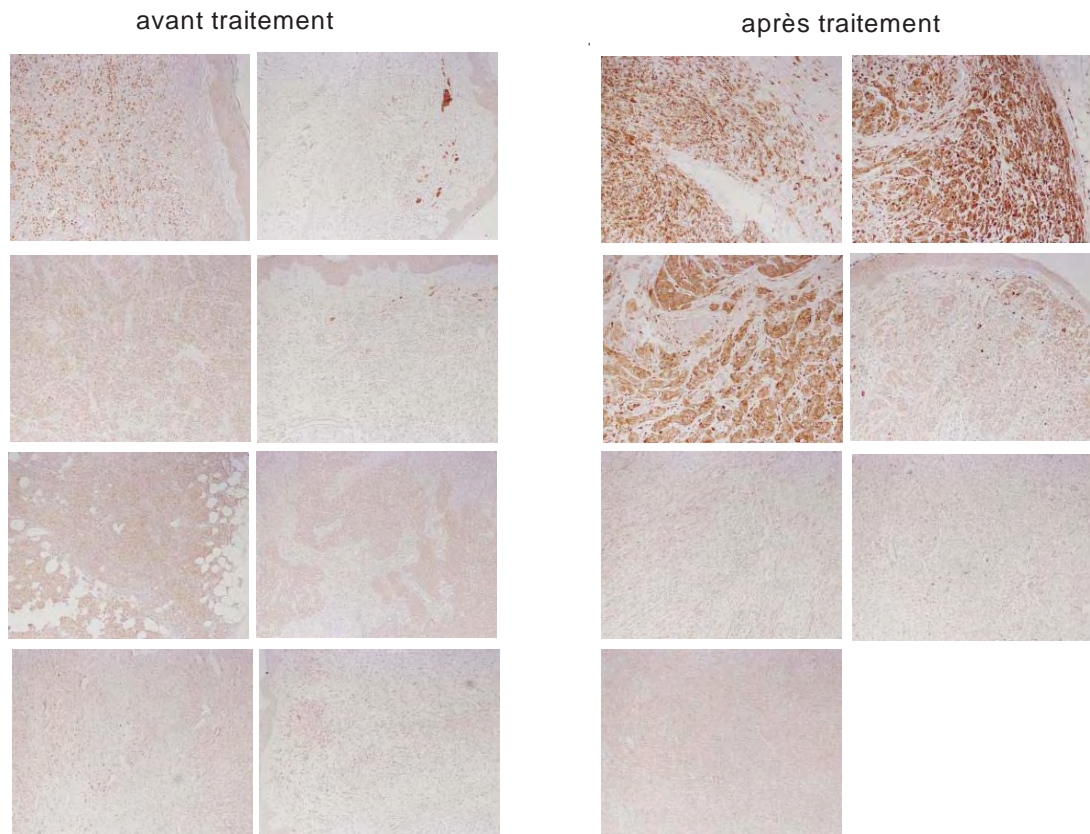
Au terme des études *in vivo* et *in vitro*, nous avons voulu éprouver notre modèle dans un contexte clinique. Grâce à une collaboration avec N. Meyer (clinicien dermatologue) et L. Lamant (anatomopathologiste) du CHU de Purpan, Toulouse, nous avons pu accéder à des échantillons de 8 patients atteints de mélanome métastatique (tableau 13). Les échantillons analysés correspondent à des prélèvements de type métastases cutanées et sous-cutanées (stade IV AJCC). Suivant les échantillons, le type de fixation utilisée est également variable avec pour certains une fixation au formol et pour d'autres au Bouin.

Ils ont été répartis en deux groupes selon que les patients aient ou non reçu un traitement par chimiothérapie avant la date du prélèvement. Dans le cas de trois patients (patients 6, 7 et 8), nous disposons d'un suivi avant et après traitements grâce à des prélèvements itératifs. Tous les patients ont reçu un traitement par monochimiothérapie au déticène (dacarbazine) (tableau 14).

4.2 Expression d'ABCB5 avec ou sans traitement dans les échantillons cliniques

L'expression d'ABCB5 a été évaluée dans les différents échantillons par une méthode d'immunohistochimie avec l'anticorps Ac^{Sigma} comme expliqué pour l'étude *in vivo*. Une analyse des groupes avec et sans traitement permet de mettre en évidence une tendance avec une expression globale d'ABCB5 plus importante dans les échantillons prélevés après traitement à la dacarbazine par rapport à ceux effectués avant traitement (figure 44). Cependant, étant donné le faible nombre de patients, aucune corrélation statistiquement significative n'a pu être réalisée.

A.



B.

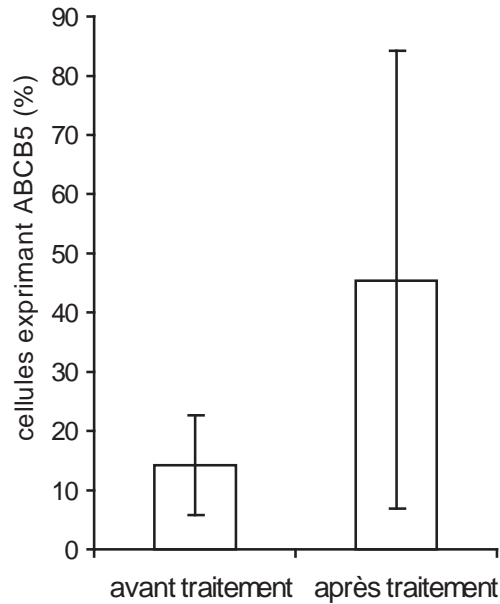


Figure 44 : Expression d'ABCB5 dans les échantillons cliniques avec ou sans traitement

L'expression d'ABCB5 a été analysée par immunohistochimie dans les échantillons cliniques avec l'anticorps Ac^{Sigma}.

A. Une image représentative du marquage de chaque échantillon est présentée et classée suivant la présence ou non de traitement au dédicene avant la date de prélèvement.

B. Le pourcentage de cellules exprimant ABCB5 dans les échantillons a été évalué et la moyenne avec et sans traitement est reportée dans le graphique.

Une étude des échantillons appariés avant et après traitement sur les trois patients correspondants n'a pas permis de mettre en évidence de corrélation entre l'expression d'ABCB5 et la présence du traitement. Cependant, il serait intéressant d'analyser ces échantillons en fonction de la réponse du patient au traitement.

Les cellules exprimant ABCB5 sont donc enrichies après traitement à des chimiothérapies classiques et ne semblent pas seulement sélectionnées mais également amplifiées. De plus, la réponse de la sous-population exprimant ABCB5 dépend donc des agents anti-cancéreux testés mais ne semble au contraire pas liée aux choix des lignées de mélanomes. ABCB5 apparaît donc comme un marqueur de résistance du mélanome aux agents de chimiothérapie classique dont ceux utilisés en clinique comme traitement de référence pour le mélanome. Cependant ABCB5 appartient à la famille des transporteurs ABC et nous avons donc émis l'hypothèse que plus qu'un marqueur ABCB5 pouvait avoir un rôle fonctionnel dans le phénotype de résistance observé.

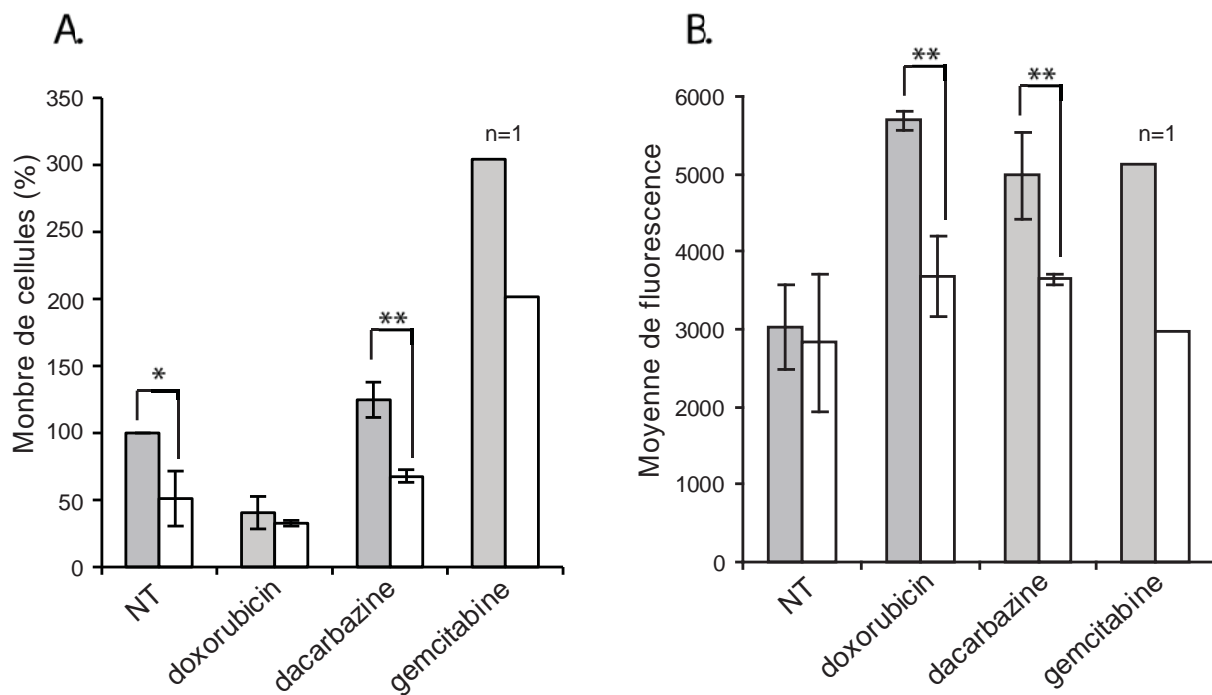


Figure 45 : L'augmentation des cellules exprimant ABCB5 sous traitement est en partie la conséquence d'une induction de l'expression d'ABCB5

Les cellules WM-266-4 ont été traitées à la doxorubicine ($5 \cdot 10^{-8}M$) à la dacarbazine ($5 \cdot 10^{-5}M$) ou à la gemcitabine ($6 \cdot 10^{-8}M$) pendant 72h. 4h avant la fin du traitement, les cellules ont été traitées à $10\mu g/mL$ de cycloheximide.

A. La survie de la population ABCB5 visualisée par comptage, marquage avec l'anticorps Ac^{Rockland} et analyse par cytométrie en flux est reportée pour chaque condition de traitement en présence (histogramme gris) ou absence (histogramme blanc) de cycloheximide.

B. L'expression d'ABCB5 a été analysée par cytométrie en flux avec l'anticorps Ac^{Rockland} et la moyenne de fluorescence de la population exprimant ABCB5 est reportée en présence (histogramme blanc) ou absence (histogramme gris) de cycloheximide.

LA PROTEINE ABCB5 EST IMPLIQUEE DIRECTEMENT OU INDIRECTEMENT DANS LE PHENOTYPE DE CHIMIORESISTANCE DU MELANOME

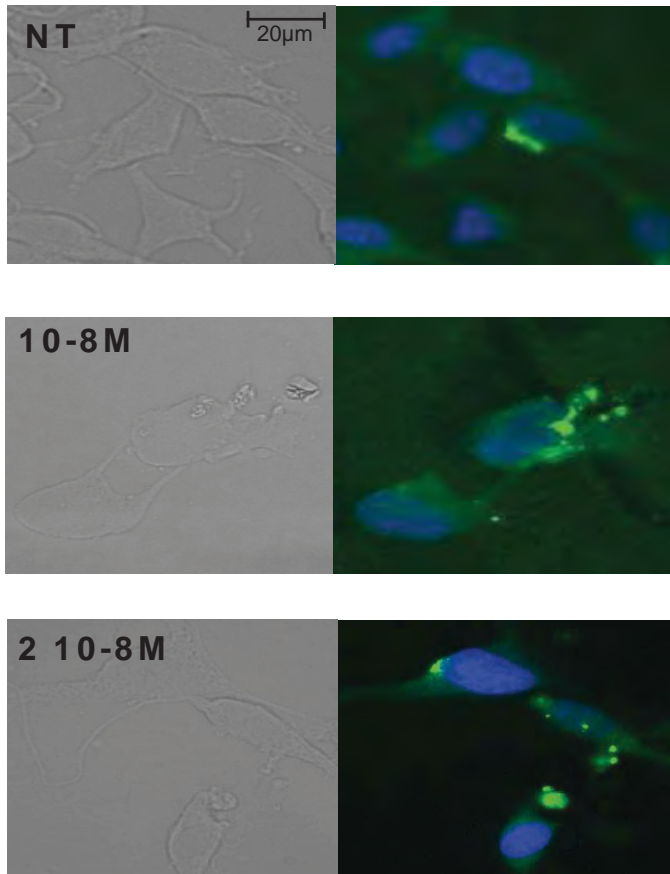
1 L'EXPRESSION D'ABCB5 EST REGULEE FACE AU TRAITEMENT PAR DES AGENTS DE CHIMIOOTHERAPIE CLASSIQUE

1.1 L'expression d'ABCB5 est induite suite à un traitement par des agents de chimiothérapie

Afin de statuer sur l'implication d'ABCB5 dans la chimiorésistance caractérisée précédemment, une étude mécanistique préliminaire a été réalisée. L'augmentation d'ABCB5 visualisée en ARNm et en protéine après traitement peut être la conséquence soit d'une sélection des cellules exprimant ABCB5 soit d'une induction (liée à une augmentation de la synthèse transcriptionnelle et/ou traductionnelle ou à une stabilisation des transcrits et/ou de la protéine).

Pour savoir si l'induction de l'expression d'ABCB5 pouvait être due à une augmentation de la production de protéine, nous nous sommes penchés sur la néo-synthèse traductionnelle. Une étude a donc été développée dans ce sens en utilisant le cycloheximide, un inhibiteur de la traduction. En absence de tout traitement par des agents anti-cancéreux, l'ajout du cycloheximide entraîne une diminution de la détection de la sous-population exprimant ABCB5 suggérant un renouvellement physiologique de la protéine. Le traitement au cycloheximide permet également de réverser une partie de l'augmentation de la sous-population exprimant ABCB5 après dacarbazine (figure 45 A.) ou gemcitabine (figure 45 B.). Une analyse en moyenne de fluorescence permet également de visualiser une réversion partielle de l'augmentation du niveau d'expression d'ABCB5 par cellules pour la dacarbazine, la gemcitabine et la doxorubicine (figure 45 C.). Ces résultats suggèrent que l'augmentation

A



B

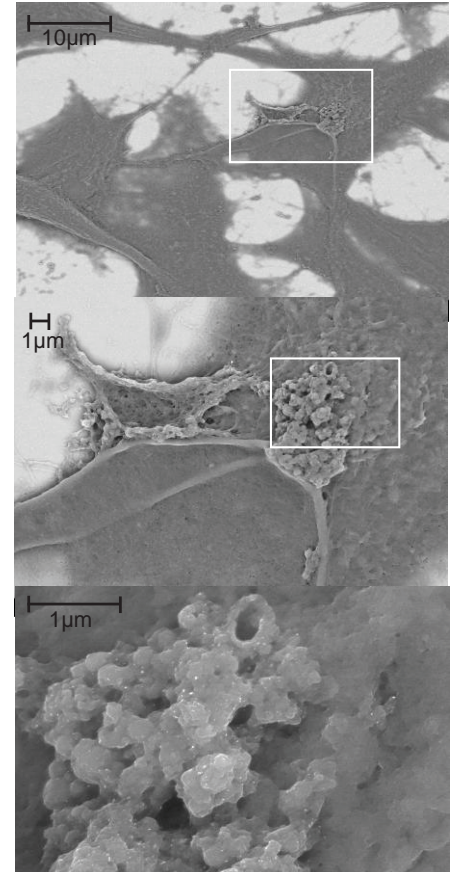


Figure 46 : La protéine ABCB5 est présente à la surface des cellules après traitement

A. Les cellules WM-266-4 ont été traitées 72h aux doses indiquées de gemcitabine ou non (NT) et l'expression d'ABCB5 a été analysée par immunofluorescence en DIC (pour Contrast Interférentiel Différentiel) (image de gauche) et en DAPI en bleu et pour le marquage par l'AC^{Rockland} en vert (image de gauche).

B. Les cellules WM-266-4 ont été traitées 72h à $6 \cdot 10^{-8}M$ de gemcitabine et un marquage AC^{Rockland} couplé bille d'or de 10nm de diamètre a été réalisé pour être analysé en microscopie électronique à balayage. Les photographies représentent de haut en bas respectivement des zooms de l'image précédente représentée par le rectangle blanc.

du nombre de cellules exprimant ABCB5 ainsi que le niveau d'expression d'ABCB5 après traitement pourrait être la conséquence d'une néo-synthèse. De plus comme les reversions observées ne sont pas totales, il ne s'agirait pas du seul élément de régulation. Il est cependant important de rappeler que l'action du cycloheximide n'est pas spécifique d'ABCB5 et il est donc envisageable que les résultats obtenus ne sont pas en lien direct avec l'inhibition de la synthèse d'ABCB5.

1.2 La protéine ABCB5 est mobilisée à la membrane plasmique en réponse au traitement

La synthèse protéique d'ABCB5 étant stimulée sous traitement, nous nous sommes demandés si le transporteur ABCB5 était également mobilisé à la membrane. Des marquages membranaires en immunofluorescence après traitement ont tout d'abord été réalisés avec l'anticorps AC^{Rockland} sur les cellules WM-226-4. Une évaluation du nombre de cellules marquées montre de façon cohérente avec la cytométrie en flux une augmentation du pourcentage de cellules positives. Nous avons également noté des différences de phénotypes entre les échantillons traités et non traités. En effet, si les cellules non traitées présentent essentiellement un seul point de marquage, les cellules traitées montrent au contraire plusieurs points de marquage qui restent focalisés dans une zone particulière de la cellule (figure 46 A.). Ces zones semblent particulièrement perturbées au niveau de la membrane plasmique visible en contraste de phase.

Ces premières observations ont ensuite été confirmées par microscopie électronique à balayage, une technique d'imagerie beaucoup plus précise dans le détail des structures cellulaires. Un marquage avec l'anticorps Ac^{Rockland} couplé à des billes d'or nous a confirmé qu'ABCB5 est présent à la membrane après traitement cytotoxique à la gemcitabine. Le marquage aux billes d'or se localise également préférentiellement dans des structures membranaires particulières (figure 46 B.).

Une étude sur l'effet de la Brefeldine A après traitement a également été entreprise afin de quantifier l'effet de la mobilisation de la protéine ABCB5 à la membrane. La Brefeldine A est une substance qui inhibe le transport du Réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et favorise le transport de l'appareil de Golgi vers le Réticulum endoplasmique, ce qui conduit finalement à une inhibition du transport vers la membrane

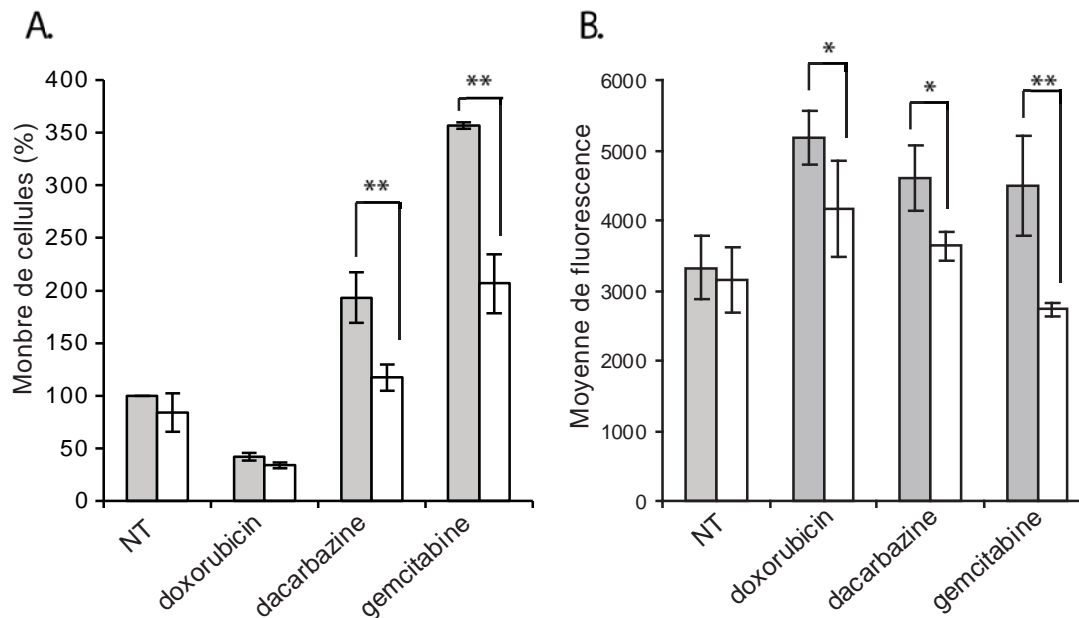


Figure 47 : La protéine ABCB5 est mobilisée à la membrane plasmique sous traitement par des agents anti-cancéreux

Les cellules WM-266-4 ont été traitées à la doxorubicine ($5 \times 10^{-8}M$) à la dacarbazine ($5 \times 10^{-5}M$) ou à la gemcitabine ($6 \times 10^{-8}M$) pendant 72h. 24h avant la fin du traitement, les cellules ont été traitées à $10\mu g/mL$ de Brefeldine A.

A. La survie de la population ABCB5 visualisée par comptage, marquage avec l'anticorps Ac^{Rockland} et analyse par cytométrie en flux est reportée pour chaque condition de traitement en présence (histogramme blanc) ou absence (histogramme gris) de Brefeldine A.

B. L'expression d'ABCB5 a été analysée par cytométrie en flux avec l'anticorps Ac^{Rockland} et la moyenne de fluorescence de la population exprimant ABCB5 est reportée en présence (histogramme blanc) ou absence (histogramme gris) de Brefeldine A.

plasmique. A l'état basal, aucune différence n'est visualisée avec ou sans Brefeldine A ni sur le nombre de cellules exprimant ABCB5 ni en terme de niveau d'expression d'ABCB5 par cellule. Cependant, un blocage du transport vers la membrane par la Brefeldine A permet de reverser une partie de l'augmentation de la sous-population exprimant ABCB5 sous traitement à la dacarbazine (figure 47 A.) ou à la gemcitabine. L'analyse de la moyenne de fluorescence des cellules positives pour ABCB5 après traitement à la dacarbazine, à la gemcitabine ou à la doxorubicine, nous a également permis de noter une différence significative entre les échantillons avec et sans Brefeldine A (figure 47 B.). Ces résultats suggèrent que la protéine ABCB5 est mobilisée à la membrane plasmique suite au traitement par les agents anti-cancéreux. Cependant, tout comme pour le cycloheximide, la réversion entraînée par la Brefeldine A n'est pas totale laissant penser qu'il ne s'agit pas du seul élément mécanistique mis en jeu.

L'ensemble de ces données nous apprend que la protéine ABCB5 est néo-synthétisée en réponse à un traitement pharmacologique par des agents anti-cancéreux et que le pool de protéines synthétisées ou un pool de protéines déjà existantes est mobilisé à la membrane plasmique. Néanmoins, il n'est pas possible de conclure sur les mécanismes qui conduisent à la diminution du nombre de cellules exprimant ABCB5 détectées après inhibition de la synthèse ou du transport.

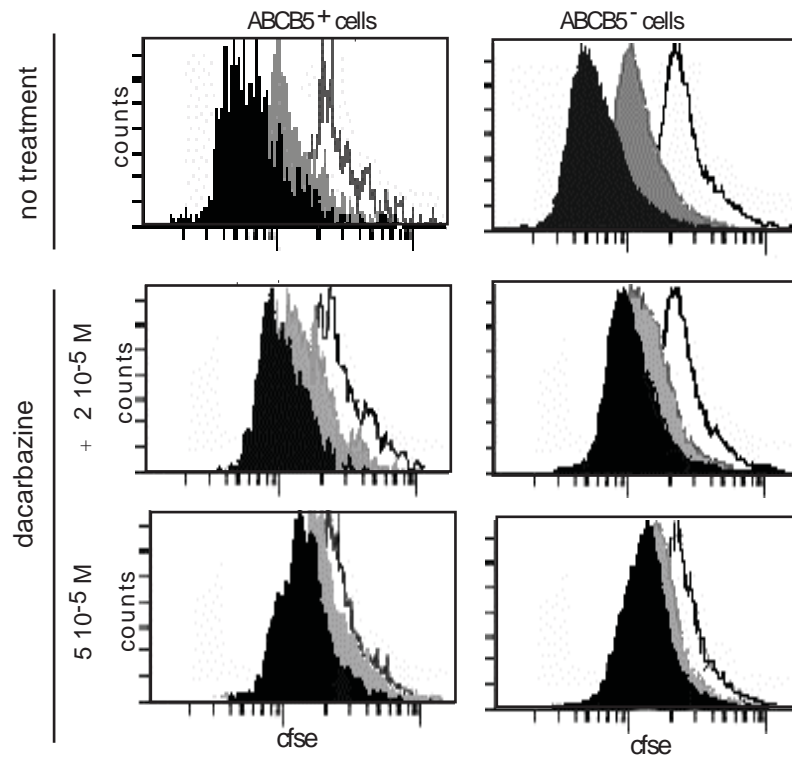


Figure 48 : Les cellules exprimant ABCB5 continuent à proliférer sous traitement à la dacarbazine

Les cellules WM-266-4 ont été marquées au CFSE. Après 24h de marquage, les cellules ont été traitées aux doses indiquées de dacarbazine. L'expression d'ABCB5 a été analysée par cytométrie en flux (anticorps AC^{Rockland}) et la dilution du CFSE intracellulaire a été suivie au cours du temps à 24h (histogramme blanc), 48h (histogramme gris) et 72h (histogramme noir).

2 LES CELLULES ABCB5 SONT SELECTIONNEES EN REPONSE AU TRAITEMENT PAR CHIMIOOTHERAPIE

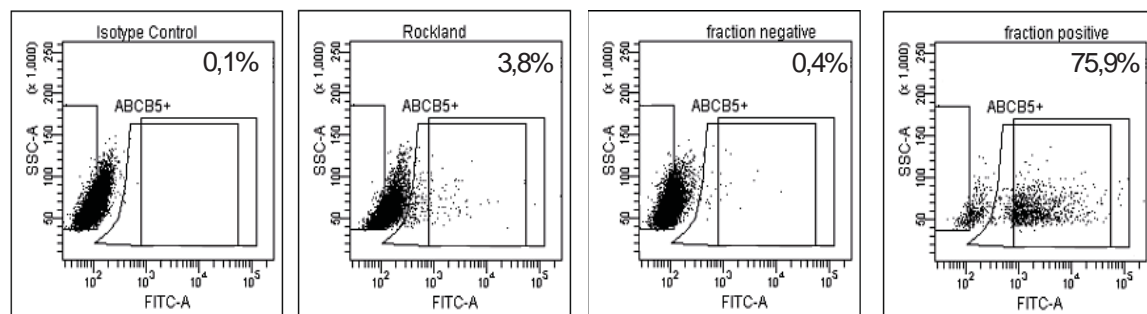
Les résultats présentés ci-dessus montrent une induction de la synthèse protéique d'ABCB5 ainsi qu'une mobilisation à la membrane suite aux traitements cytotoxiques. La quantité de cellules exprimant ABCB5 à leur surface est donc augmentée ainsi que la quantité de protéine pour une cellule positive donnée. Nous nous sommes donc demandés si les cellules ABCB5 possédaient un avantage de survie.

2.1 Les cellules exprimant ABCB5 résistent et prolifèrent après traitement par des agents de chimiothérapie

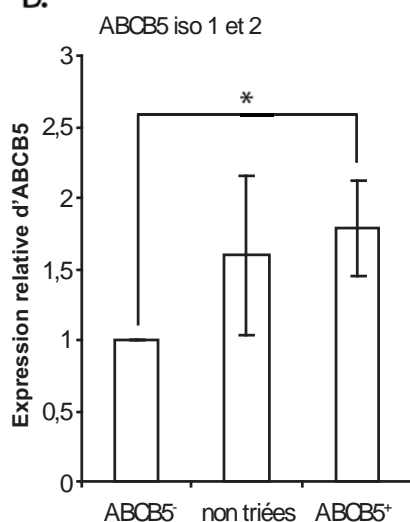
Nous venons de voir qu'une partie de l'augmentation de la sous-population visible après traitement par des composés de chimiothérapie peut être en partie reliée à une induction de l'expression de la protéine ABCB5 ainsi qu'à une mobilisation à la membrane. Nous avons ensuite cherché à savoir si l'augmentation du nombre de cellules exprimant ABCB5 pouvait être reliée à une prolifération de ces cellules.

Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la prolifération des cellules exprimant ABCB5 par rapport aux cellules ne l'exprimant pas au cours d'un traitement par des agents anti-cancéreux. La prolifération a été visualisée par la dilution d'un colorant cytoplasmique, le CFSE (pour CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester), dilué de façon équivalente entre les cellules filles au cours des divisions cellulaires. Suite à un marquage au CFSE, les cellules ont été traitées à la dacarbazine et la dilution du colorant au travers des divisions cellulaires a été suivie au cours du temps de façon concomitante à un marquage ABCB5. Parmi les populations vivantes il faut tout d'abord noter que les cellules continuent à diluer le colorant suite au traitement à la dacarbazine mais de façon moins importante que dans la condition non traitée (figure 48). De plus, cette inhibition de la prolifération est dose-dépendante. Cependant, même à la dose de dacarbazine la plus élevée, l'ensemble de population survivante (dont la population exprimant ABCB5) dilue encore le CFSE au cours du temps. Cela signifie que ces cellules, qu'elles expriment ou non ABCB5, continuent à se diviser malgré le traitement. Les cellules exprimant ABCB5 continuent donc à proliférer même en présence de traitement par chimiothérapie.

A.



B.



C.

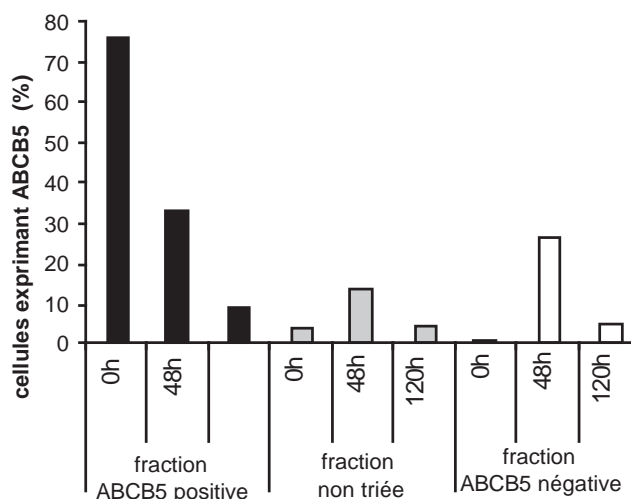


Figure 49 : Mise en place d'un outil de tri cellulaire par cytométrie en flux

A. Les cellules WM-266-4 ont été marquées par un isotype contrôle (dot plot de gauche) ou l'anticorps AC^{Rockland} (deuxième dot plot). Le tri a été réalisé en utilisant respectivement la fenêtre de gauche pour les cellules négatives, et de droite pour les cellules positives. Les cellules triées ont été ré-analysées (fraction négative sur le troisième dot plot et fraction positive sur le dot-plot de gauche). Le pourcentage de cellules exprimant ABCB5 est indiqué.

B. Les cellules triées par cytométrie en flux ont été analysées pour leur expression relative d'ABCB5 isoformes 1 et 2 (couple d'amorces 1) par PCR quantitative en temps réel.

C. Les cellules triées par cytométrie en flux ont été remises en culture et l'expression d'ABCB5 a été suivie au cours du temps par marquage avec AC^{Rockland} et cytométrie en flux dans les différentes fractions. Le pourcentage de cellules exprimant ABCB5 est reporté en fonction du temps.

2.2 Le tri cellulaire ne nous permet pas de conclure quant à l'avantage de survie des cellules exprimant ABCB5

Toujours dans l'idée de vouloir mettre en évidence des différences de survie entre les populations positives et négatives pour ABCB5 au cours d'un traitement pharmacologique, nous avons décidé de trier les cellules exprimant ABCB5 et les cellules n'exprimant pas ABCB5 pour les soumettre séparément au traitement à la dacarbazine et à la gemcitabine afin de voir s'il existe entre les deux populations des différences d'IC₅₀ pour ces deux composés.

J'ai donc mis au point un tri cellulaire par cytométrie en flux avec l'anticorps AC^{Rockland}. L'enrichissement obtenu après tri est supérieur d'un facteur 10 et la proportion de cellules exprimant ABCB5 varie de 60 à 80% suivant les expériences pour la fraction positive (ABCB5⁺) (figure 49 A.). La viabilité des fractions cellulaires après tri a été contrôlée par marquage au bleu trypan ; elle est de 90%. J'ai réalisé une extraction d'ARN sur les fractions triées et le dosage des ARNm issus des différentes fractions. Cette expérience a permis de montrer un enrichissement d'un facteur 2 des ARNm ABCB5 (isoforme 1 et 2) dans la fraction positive par rapport à la fraction négative. Cet enrichissement est faible mais reproductible et statistiquement significatif (figure 49 B.). J'ai également optimisé la remise en culture des cellules triées et j'ai suivi l'évolution de la proportion de cellules exprimant ABCB5 au cours du temps (figure 49 C.). On remarque que l'expression d'ABCB5 dans les fractions positives est relativement vite perdue puisque après seulement 5 jours, le pourcentage de cellules positives est revenu à sa valeur d'avant le tri. Cette caractéristique avait déjà été observée et par recoupement avec les études déjà publiées cela permet de penser qu'une population exprimant ABCB5 est capable de redonner une population hétérogène (Frank et al. 2005). Cependant, il ne faut pas exclure la possibilité que les cellules négatives contaminantes aient proliféré préférentiellement et que la population après tri soit le reflet de cette prolifération des cellules négatives. La fraction négative quant à elle révèle la présence d'une population exprimant ABCB5 dans les jours suivant le tri (15% à 48h après tri) qui revient elle aussi à la valeur basale en moins d'une semaine. Cette augmentation pourrait être le résultat d'une prolifération des cellules positives contaminantes mais on pourrait également imaginer que le tri ne permet de discriminer seulement les cellules exprimant ABCB5 à leur surface et non l'ensemble de la population positive, ce qui

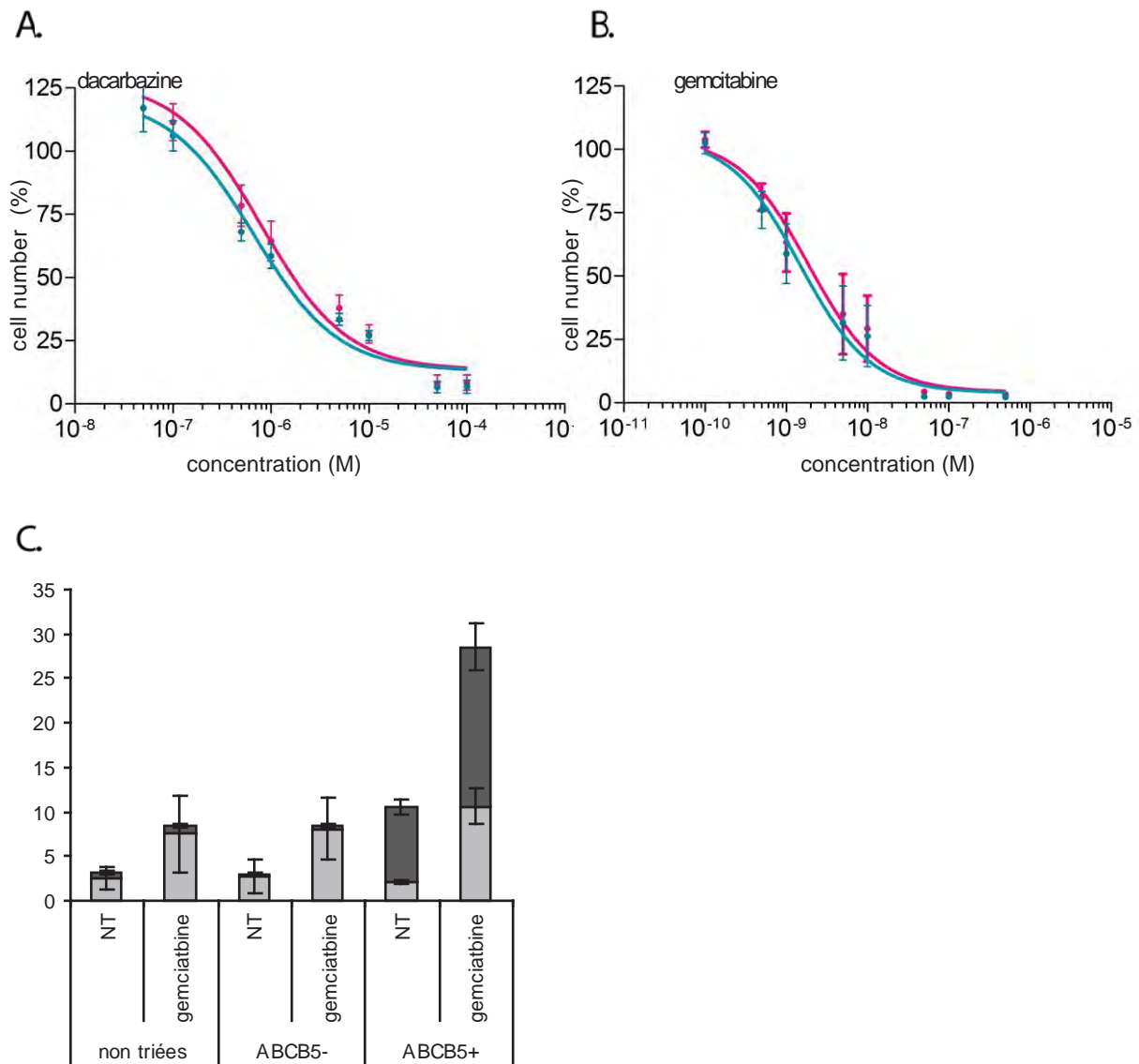


Figure 50 : Les expériences de tri ne permettent pas de conclure sur la résistance des cellules exprimant ABCB5 sous traitement

Les cellules WM-266-4 ont été triées après marquage membranaire ABCB5 (anticorps AC^{Rockland}) et les différentes fractions ont été remises en culture.

A et B. 24h après tri les différentes fractions ont été traitées aux doses indiquées à la dacarbazine (A.) ou à la gemcitabine (B.). 72h après le début du traitement, la survie des cellules des cellules triées ABCB5 positives (courbe rouge) et ABCB5 négatives (courbe bleue) a été analysée par une technique de dosage de l'ATP.

C. 24h après tri les différentes fractions ont été traitées à la gemcitabine (B.). 72h après le début du traitement, l'expression d'ABCB5 a été analysée et les valeurs reportées. La présence de l'anticorps utilisé pour le tri a été vérifiée par un marquage avec un anticorps secondaire seul (en gris foncé) et l'expression *de novo* d'ABCB5 apparaît en gris clair.

expliquerait non seulement cette dernière observation mais également le faible enrichissement en ARNm après tri.

Les cellules triées et remises en culture ont été traitées à la dacarbazine ou à la gemcitabine. Aucune différence statistiquement significative entre les fractions positives et négatives pour ABCB5 n'a été visualisée en termes de résistance pour ces deux substances (figure 50 A et B.). Cependant, il convient de rappeler que le tri entrepris dans cette étude est un tri positif ce qui implique que la fraction positive porte l'anticorps, ce qui peut gêner la fonctionnalité de la pompe et masquer l'avantage de survie des cellules ABCB5, dans l'hypothèse bien sûr où la pompe d'efflux ABCB5 est fonctionnelle et que c'est elle ou du moins en partie elle qui confère aux cellules ABCB5 un avantage de survie. Il faut d'ailleurs noter que le marquage initial (réalisé pour le tri) résiste assez bien puisque un marquage résiduel de l'anticorps du tri (suivi sans nouveau marquage) est encore visible après plusieurs jours (figure 50 C.). De plus le marquage acquis (correspondant aux protéines ABCB5 non liées à un anticorps durant le traitement pharmacologique) est équivalent quelque soit la fraction de tri (environ 3% sans traitement et de l'ordre de 10% après traitement). Il faut donc envisager la possibilité que l'anticorps Ac^{Rockland} puisse être un anticorps bloquant au quel cas l'anticorps restant présent sur la protéine au cours du traitement pourrait masquer l'activité de transport et donc la résistance des cellules exprimant ABCB5.

3 ABCB5 A-T-IL UN ROLE FONCTIONNEL DANS LA RESISTANCE DU MELANOME ?

Nous avons donc montré que les cellules ABCB5 sont augmentées et amplifiées après traitement par chimiothérapie et que cette augmentation a été reliée d'une part à une induction de l'expression du transporteur ainsi qu'à une mobilisation à la membrane mais aussi à une prolifération de ces cellules sous traitement. Des données de la littérature suggèrent que le transporteur ABCB5 pourrait avoir une fonction d'efflux de composés cytotoxiques tels que la doxorubicine (Frank et al. 2005). Nous avons donc voulu évaluer le rôle fonctionnel du transporteur ABCB5 dans la survie de cette sous-population suite à des traitements pharmacologiques.

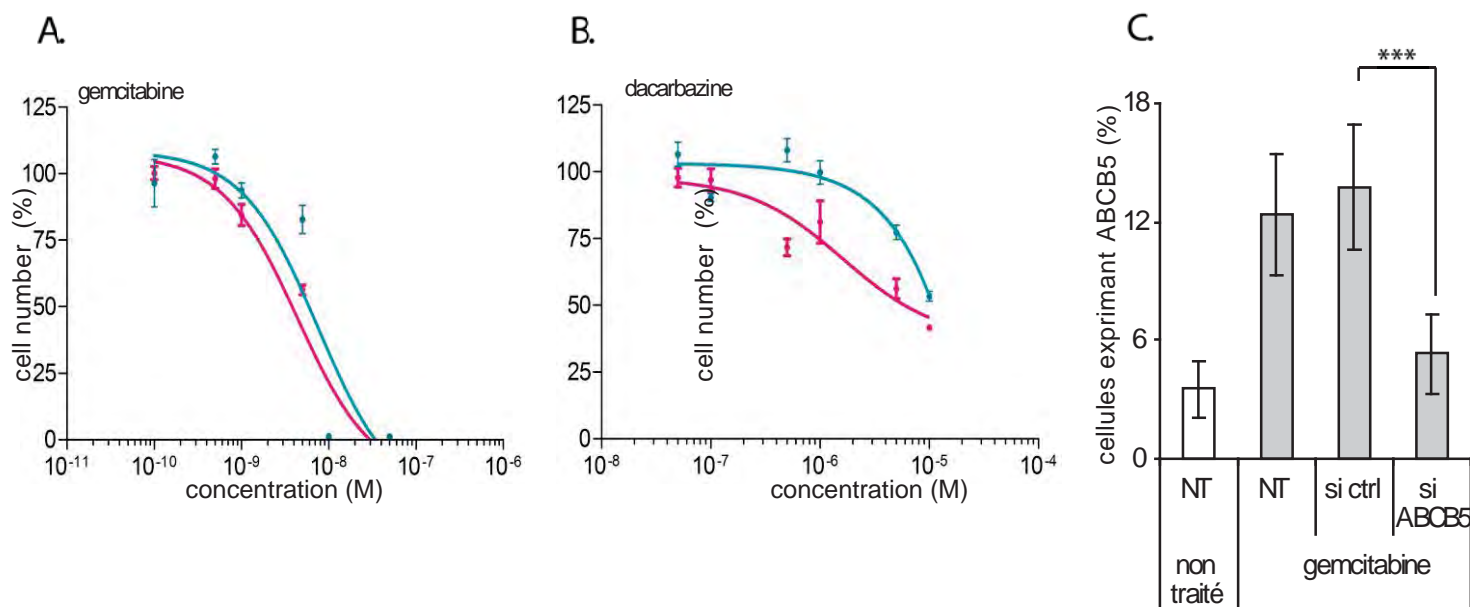


Figure 51 : Stratégie d'extinction transitoire d'ABCB5 par siRNA

Les cellules WM-266-4 ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou ABCB5.

A et B. 24h après transfection les cellules ont été traitées aux doses indiquées à la dacarbazine (A.) ou à la gemcitabine (B.). 72h après le début du traitement, la survie des cellules transfectées par le siRNA contrôle (courbe rouge) et le siRNA ABCB5 (courbe bleue) a été analysée par une technique de dosage de l'ATP.

C. 24h après transfection les cellules ont été traitées à la gemcitabine. 72h après le début du traitement, la survie des cellules non transfectées, transfectées par le siRNA contrôle et transfectées le siRNA ABCB5 ont été analysées pour leur expression d'ABCB5 par cytométrie en flux.

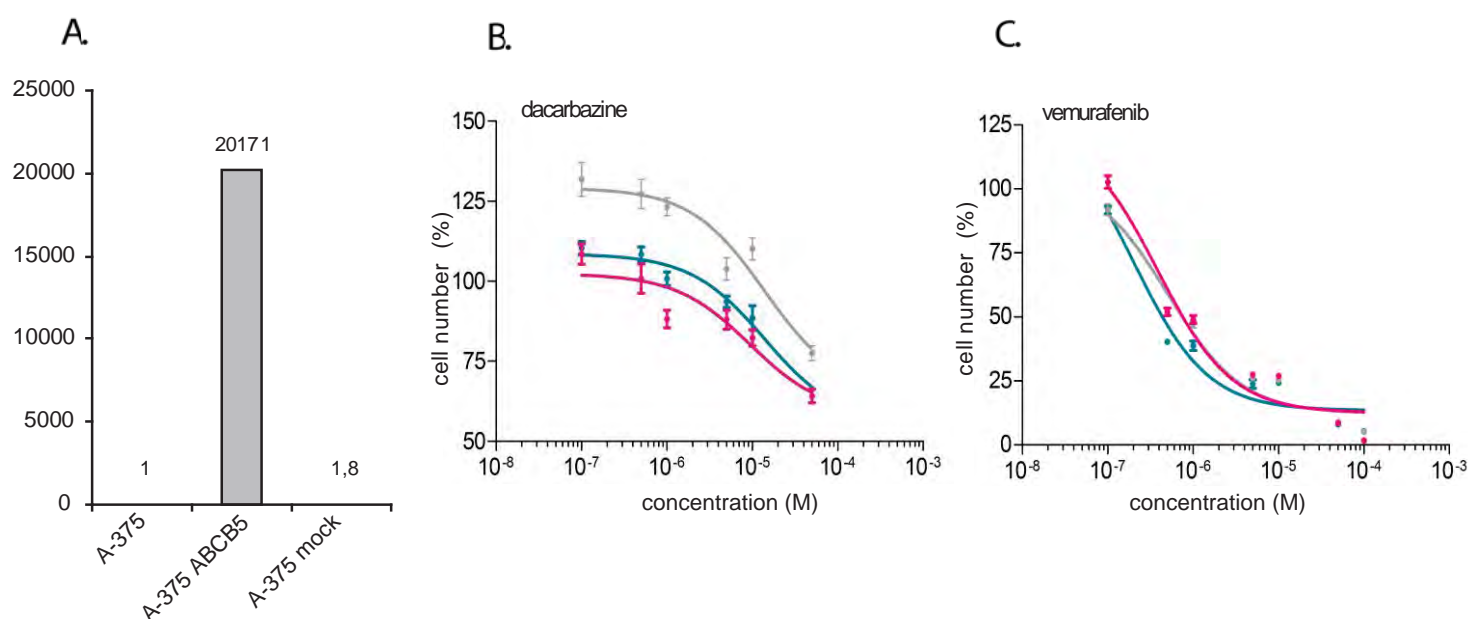


Figure 52 : Stratégie de sur-expression transitoire d'ABCB5

Les cellules A-375 ont été transfectées avec un vecteur vide ou un vecteur de sur-expression d'ABCB5 isoforme 2.

A. L'expression d'ABCB5 a été analysée par PCR quantitative en temps réel dans les cellules non transfectées (A-375), transfectées par le vecteur vide (A-375 mock) et transfectée par le vecteur de sur-expression d'ABCB5 isoforme 2 (A-375 ABCB5).

C et D. 24h après transfection les cellules ont été traitées aux doses indiquées à la dacarbazine (C.) ou à la vemurafenib (D.). 72h après le début du traitement, la survie des cellules A-375 non transfectées (courbe bleue), transfectées par le vecteur vide (courbe grise) et le vecteur de sur-expression d'ABCB5 isoforme 2 (courbe rose) a été analysée par une technique de dosage de l'ATP.

3.1 Extinction siRNA

Pour répondre à cette question, j'ai entrepris une étude d'extinction siRNA. Les cellules WM-266-4 ont été transfectées avec un siRNA ciblant ABCB5 ou un siRNA contrôle et 24h après transfection, les cellules ont été traitées à la dacarbazine ou à la gemcitabine. Après 72h de traitement, la survie des cellules a été évaluée par une technique de dosage de l'ATP (figure 51 A et B.). Aucune différence significative n'a été observée entre la survie des cellules transfectées par le siRNA ABCB5 et celles transfectées par le siRNA contrôle. Cependant il faut noter que l'extinction siRNA n'est pas totale et que seuls deux tiers de l'expression protéique sont perdus (figure 51 C.). Il reste donc encore après traitement et siRNA un niveau d'expression d'ABCB5 similaire à son expression basale.

3.2 Sur-expression transitoire d'ABCB5 isoforme 2

Une approche par sur-expression a également été entreprise au sein de l'équipe. Un vecteur de sur-expression d'ABCB5 isoforme 2 taguée par l'étiquette Flag en N-terminal a ainsi été construit. Des transfections transitoires ont été réalisées dans la lignée A-375 n'exprimant que très peu ABCB5 et ont été validées par PCR quantitative par Aline Stennevin (figure 52 A.). J'ai traité à la dacarbazine et au vemurafenib les cellules transfectées de façon transitoire soit par le vecteur vide (A-375 mock) soit par le vecteur exprimant ABCB5 isoforme 2 (A-375 ABCB5). Après 72h de traitement la survie des cellules a été analysée par une technique de dosage de l'ATP (figure 52 B. et C.). Aucune différence n'a été visualisée après sur-expression de la protéine ABCB5 isoforme 2.

3.3 Sur-expression stable d'ABCB5 isoforme 2

Au sein de l'équipe, une stratégie de lignées exprimant de façon stable la protéine ABCB5 isoforme 2 a été mise en place par sélection clonale par Aline Stennevin. Comme pour les transfections transitoires, la lignée A-375 a été choisie pour sa faible expression basale d'ABCB5. La lignée A-375 a donc été transfectée par le vecteur de sur-expression contenant ou ne contenant pas le gène d'ABCB5 puis sélectionnée par la généticine avant que les clones soient isolés. Les clones ont ensuite été validés par PCR-quantitative au niveau ARN messager et par Western-Blot au niveau protéique (figure 53 A.). La sensibilité de la lignée A-375 a été comparée à celle des clones vides (A-375 mock clone 5) et sur-exprimant ABCB5 (A-375 ABCB5 clone 16) pour la dacarbazine et le vemurafenib par une technique de dosage de

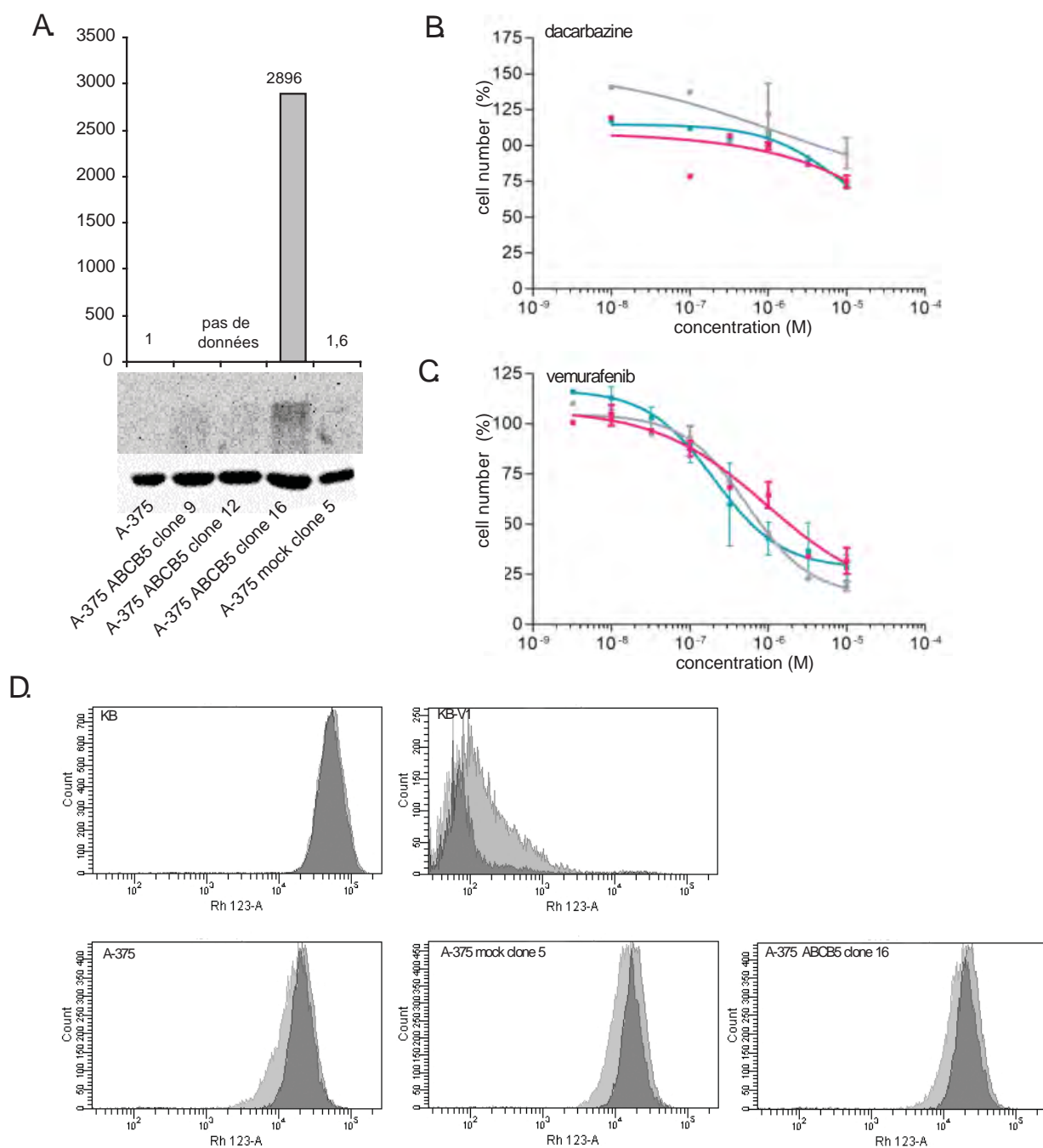


Figure 53 : Stratégie de clones stables sur-exprimant ABCB5 isoforme 2

Les cellules A-375 ont été transfectées avec un vecteur vide ou un vecteur de sur-expression d'ABCB5 isoforme 2 et des clones stables ont été établis par sélection à la généticine.

A. L'expression d'ABCB5 a été analysée par PCR quantitative en temps réel (histogramme) ou par Western Blot avec un anticorps anti-flag (gel) dans les cellules non transfectées (A-375), les clones issus de la transfection par le vecteur vide (A-375 mock clone 5) et issus de la transfection par le vecteur de sur-expression d'ABCB5 isoforme 2 (A-375 ABCB5 clone 9, 12 et 16).

B et C. Les cellules non transfectées et les clones 5 (mock) et 16 (ABCB5) ont été traitées aux doses indiquées à la dacarbazine (C.) ou à la vemurafenib (D.). 72h après le début du traitement, la survie des cellules A-375 non transfectées (courbe bleue), le clone 5 mock (courbe grise) et le clone 16 sur-exprimant ABCB5 isoforme 2 (courbe rose) a été analysée par une technique de dosage de l'ATP.

D. Les cellules KB, KBV1, A-375 et les clones 5 (mock) et 16 (sur-exprimant ABCB5 isoforme 2) ont été étudiés pour leur capacité à éffluer la rhodamine 123. Après 60 min d'efflux (histogramme gris foncé) ou en présence de vérapamil (histogramme gris clair) a été évaluée par cytométrie en flux. Les cellules KB ont été utilisées comme contrôle négatif d'efflux et les cellules KB-V1 comme contrôle positif.

l'ATP (figure 53 B. et C.). Aucune différence significative n'a été visualisée suggérant que soit la protéine sur-exprimée n'est pas fonctionnelle soit la protéine ABCB5 isoforme 2 ne confère pas de résistance à ces deux composés. La fonctionnalité de la pompe ABCB5 a ensuite été testée par des expériences d'efflux de la rhodamine 123 comme cela avait déjà été décrit dans la littérature (Frank et al. 2003; Frank et al. 2005). Cependant aucun efflux de rhodamine n'a été observé ni pour la lignée A-375 et les A-375 mock clone 5, ni pour les A-375 ABCB5 clone 16 suggérant encore une fois que la protéine sur-exprimée n'est pas fonctionnelle (figure 53 D.).

Aucune donnée ne nous permet donc à ce jour de conclure sur un rôle fonctionnel du transporteur ABCB5 dans le phénotype observé après traitement pharmacologique. Cependant la protéine ABCB5 semble bien impliquée dans le phénotype de résistance tout du moins par un mécanisme indirect étant donné que son expression est régulée face au traitement par chimiothérapie classique et qu'elle est mobilisée à la membrane plasmique.

ABCB5 EST UN MARQUEUR DE LA RESISTANCE A LA NOUVELLE GENERATION DE MOLECULES ANTI- MELANOMES

Les résultats précédemment exposés montrent une propriété particulière des cellules exprimant ABCB5 dans la chimiorésistance du mélanome métastatique en réponse à des chimiothérapies classiques de référence pour cette pathologie, à savoir la dacarbazine et le temozolomide. Cependant, comme nous l'avons vu, des thérapies ciblées prometteuses sont aujourd'hui testées au cours d'essais cliniques pour le traitement du mélanome métastatique avec notamment le Vemurafenib. Ce composé a montré une efficacité spectaculaire en termes de régression tumorale, mais l'apparition de mécanismes de résistance à ces molécules a déjà été observée. Etant donné le développement très récent de ces nouvelles molécules ainsi que leur fort potentiel en clinique, la réponse de la population exprimant ABCB5 à ces nouveaux composés a été étudiée.

1 EVALUATION DU VEMURAFENIB SUR LES LIGNEES DE MELANOME *IN VITRO*

Le vemurafenib est un inhibiteur de BRAF inhibant spécifiquement une version mutée de BRAF (mutation V600E) présente dans près de 50 % des cas de mélanome. Le statut BRAF du panel de lignées de mélanome a donc tout d'abord été étudié au sein de l'équipe. L'ensemble des lignées de mélanome étudiées présente une protéine BRAF portant la mutation V600E.

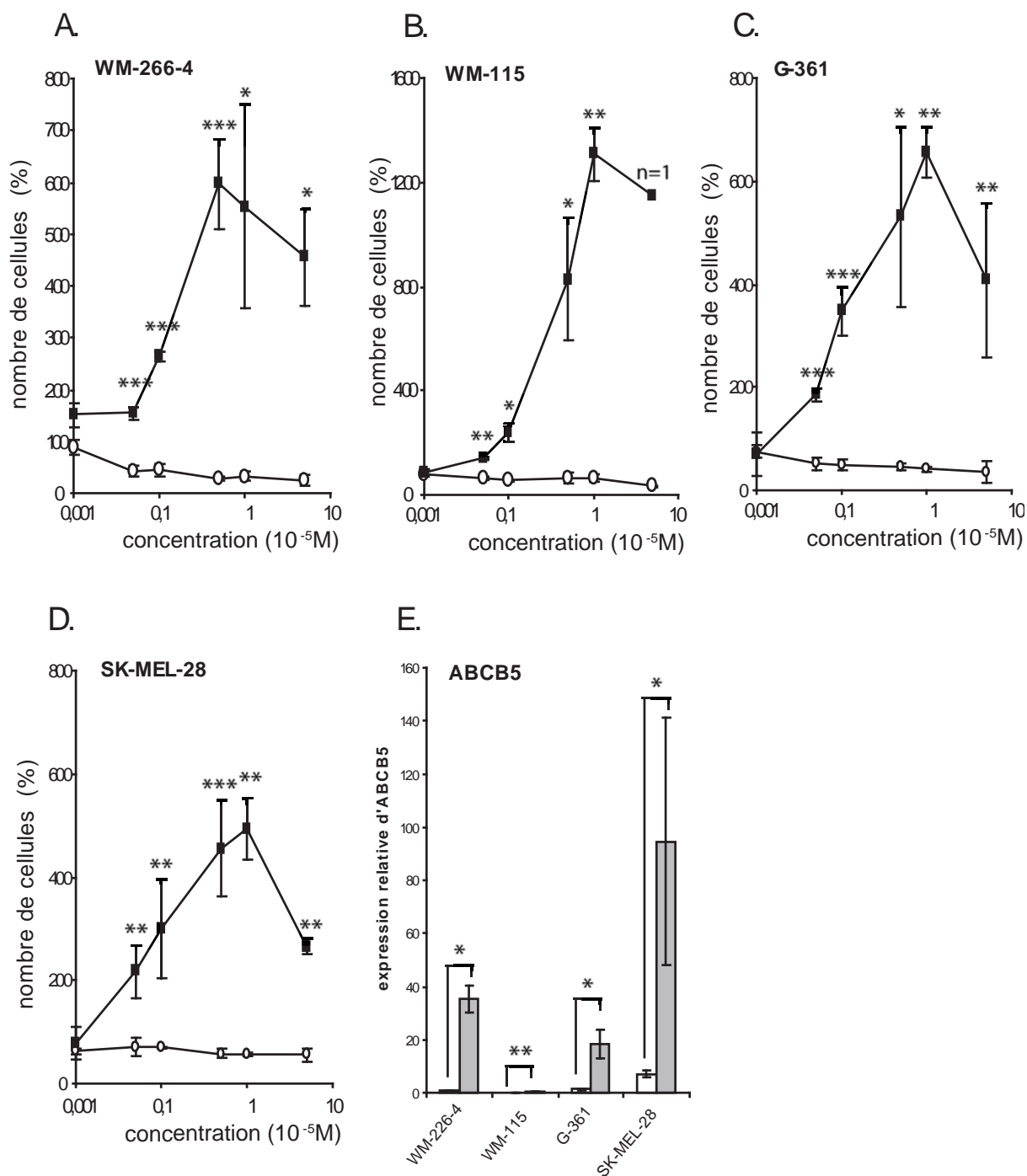


Figure 54 : ABCB5 est un marqueur de la résistance au vemurafenib sur des lignées de mélanomes *in vitro*

A. à D. Les cellules WM-266-4 (A.), WM-115 (B.), G-361 (C.) et SK-MEL-28 (D.) ont été traitées au vemurafenib pendant 72h aux doses indiquées. La survie de la population totale (ronds blancs) et de la population ABCB5 (carrés noirs) après marquage ABCB5 avec l'anticorps Ac^{Rockland} est indiquée.

E. Les cellules WM-266-4, WM-115, G-361 et SK-MEL-28 ont été traitées au vemurafenib pendant 72h aux doses indiquées et l'expression relative d'ABCB5 a été analysée par PCR quantitative en temps réel. Les valeurs des échantillons non traités sont rapportées sur les histogrammes blancs et celles des échantillons traités en gris.

1.1 Les cellules exprimant ABCB5 survivent préférentiellement à un traitement par le vemurafenib

J'ai traité l'ensemble du panel de lignées de mélanome en dose-réponse avec le vemurafenib pendant 72h. Il faut tout d'abord noter que la lignée SKMEL-28 n'est pas sensible au vemurafenib et que même à des doses importantes aucune cytotoxicité n'a été notée pour cette lignée. L'ensemble des lignées testées (WM-266-4, WM-115, G-361 et SK-MEL-28) montre une très forte augmentation de la population exprimant ABCB5 suite à un traitement au vemurafenib (figure 54 A. à D.). L'augmentation visualisée semble plus importante qu'avec les autres agents anti-cancéreux testés et ce pour l'ensemble des lignées. On peut noter que l'augmentation de la population exprimant ABCB5 est présente pour la lignée SK-MEL-28 qui n'est pourtant pas impactée par le traitement au vemurafenib. L'augmentation de l'expression d'ABCB5 a également été reproduite au niveau ARNm par PCR quantitative en temps réel pour l'ensemble des lignées de mélanome étudiées (figure 54 E.).

1.2 Le traitement au vemurafenib entraine une production de mélanine dans les cellules de mélanome

De façon remarquable, le traitement au vemurafenib entraine une production de mélanine dans les lignées G-361, SK-MEL-28 et dans une moindre mesure dans la lignée WM-266-4. Cette production de mélanine est tout d'abord visualisée par la couleur des culots cellulaires après traitement (figure 55 A.). Ce résultat a également été confirmé par un dosage de la mélanine intra-cellulaire (figure 55 B.).

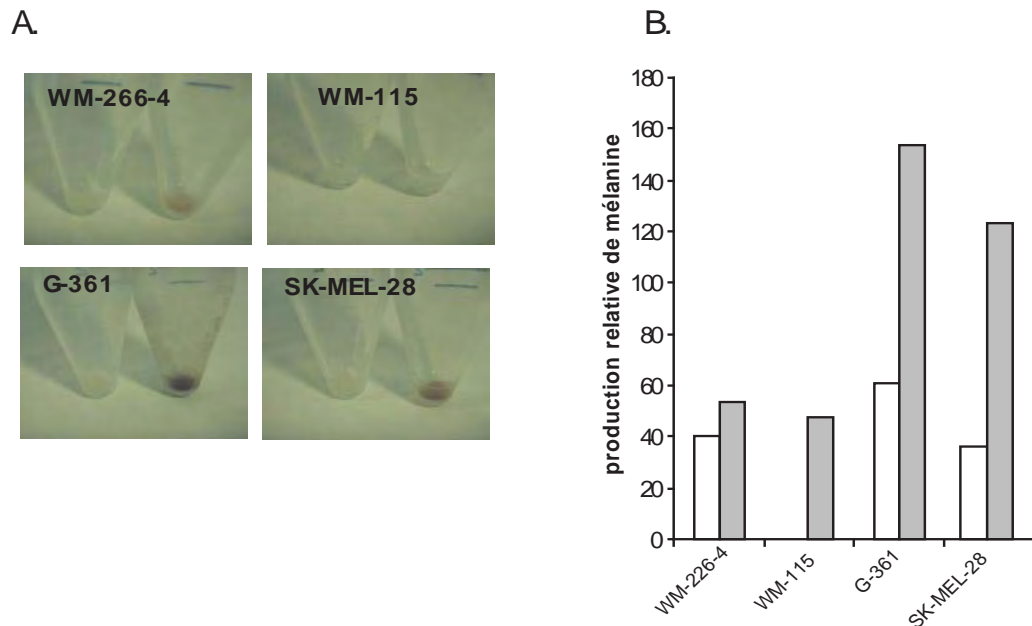


Figure 55 : Le traitement de lignées de mélanome au vemurafenib entraîne une production de mélanine

A. Les cellules WM-266-4, WM-115, G-361 et SK-MEL-28 ont été traitées au vemurafenib à la dose de 10^{-5} M pour toutes les lignées pendant 72h et les culots cellulaires photographiés (échantillons non traités à gauche et échantillons traités à droite).

B. La quantité de mélanine intracellulaire a été analysée après 72h de traitement au vemurafenib pour les lignées WM-266-4, WM-115, G-361 et SK-MEL-28. Les valeurs des échantillons non traités sont rapportées sur les histogrammes blancs et celles des échantillons traités en gris. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois

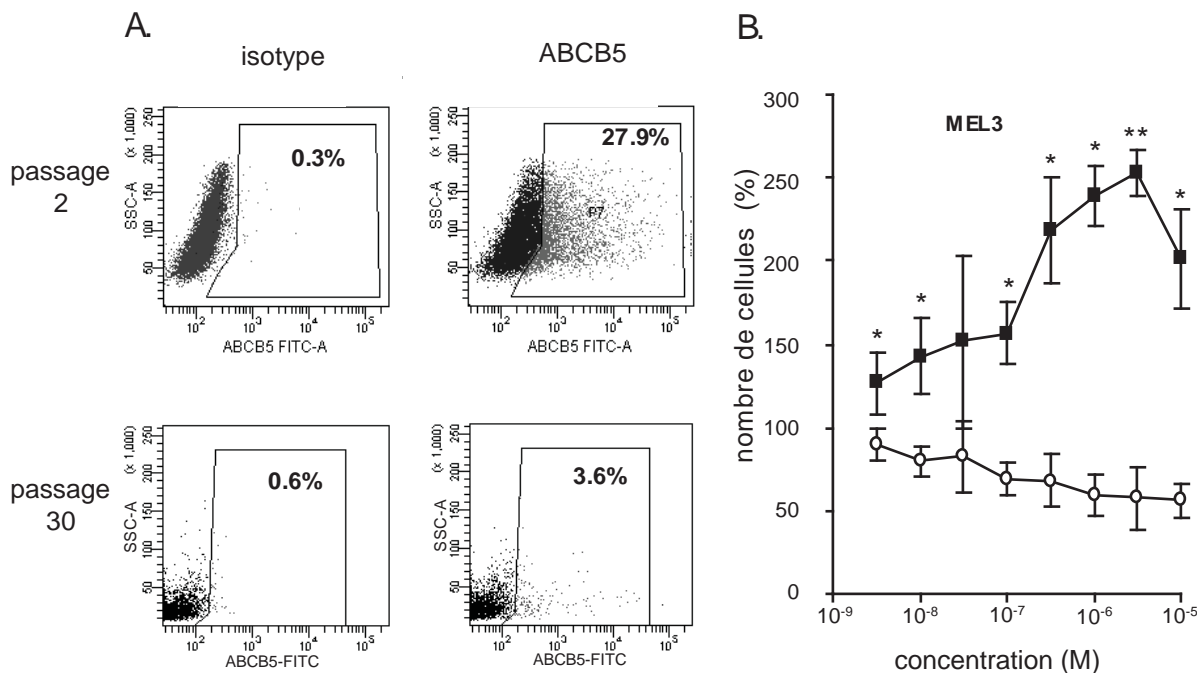


Figure 56 : ABCB5 est un marqueur de la résistance au vemurafenib sur des échantillons de patients *ex vivo*

A. La primoculture issue de la tumeur de patient MEL3 a été analysée pour son expression d'ABCB5 par cytométrie en flux peu de temps après la mise en culture (passage 2, graphiques du haut) et après 30 passages (graphiques du bas).

B. La primoculture issue de la tumeur de patients MEL3 a été traitée 72h au vemurafenib aux doses indiquées. La survie de la population totale (ronds blancs) et de la population ABCB5 (carrés noirs) après marquage ABCB5 a été analysée avec l'anticorps Ac^{Rockland}.

2 EVALUATION DU VEMURAFENIB SUR DES TUMEURS DE PATIENTS *EX VIVO*

Au sein de l'équipe, une collaboration avec des cliniciens de l'hôpital de Purpan à Toulouse a été mise en place. Grâce à cette collaboration, des tumeurs issues de métastases cutanées et sous-cutanées de patients atteints de mélanome ont pu être récupérées et remises en culture. J'ai donc eu la chance de pouvoir profiter de ce matériel biologique pour conforter les observations faites *in vitro* et *in vivo*.

A partir des échantillons de patients fraîchement dissociés, seule une tumeur a été conservée sous la forme d'une primo-culture. Cette tumeur nommée MEL3 est issue d'une métastase cutanée d'un patient ayant été traité dans un premier temps par interféron puis à la dacarbazine (déticène) jusqu'à un mois avant la date du prélèvement.

Peu de temps après la résection et la remise en culture, une forte expression d'ABCB5 est notée (20 et 40 % d'expression respectivement). Cette forte expression a été par la suite fortement diminuée jusqu'à retrouver une valeur proche de celle observée dans les lignées établies de mélanome (environ 5% à partir du 30^{ème} passage) (figure non montrée). Cette observation a été confirmée sur un fragment du même échantillon conservé *in vivo* sur des souris NSG après marquage d'immunohistochimie avec l'anticorps Ac^{Sigma} (figure 56 A.). Ce résultat nous indique que pour cette tumeur ayant subi un traitement à la dacarbazine moins d'un mois avant le prélèvement, le niveau d'expression d'ABCB5 est important et que sans continuité de ce traitement *ex vivo*, le marquage ABCB5 tend à revenir à une valeur semblable au niveau basal des lignées de mélanomes.

La tumeur MEL3 a un statut BRAF muté et un traitement au vemurafenib entraîne une cytotoxicité significative sur cette tumeur. De façon concomitante à la cytotoxicité observée sur la tumeur MEL3 en culture, une augmentation de la population exprimant ABCB5 est visualisable (figure 56 B.). Cela confirme les résultats obtenus sur les lignées de mélanomes établies.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

LES MODELES *IN VITRO* POUR L'ETUDE DE LA RESISTANCE DU MELANOME METASTATIQUE

Le mélanome est un cancer réfractaire à la chimiothérapie classique et le développement ainsi que l'amélioration des traitements actuellement disponibles sont dépendants de la compréhension des mécanismes de résistance. La chimiorésistance est donc un axe majeur de la recherche anti-mélanome.

Le modèle le plus répandu pour l'étude du mélanome est la culture de lignées établies de mélanome en monocouche. Des modèles plus évolués de culture en trois dimensions ont également été développés tels que les sphéroïdes. Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à un second modèle de sphères appelées mélanosphères. Les caractéristiques des différents modèles *in vitro* en termes de résistance ont été analysées et des propriétés particulières de résistance potentiellement exploitables des mélanosphères ont été mises en lumière.

Plus récemment, le concept des cellules CRIM (pour Cellules Résistantes Initiatrices de Mélanomes) a fait son apparition, postulant que seule une sous-population dotée de caractéristiques particulières serait responsable à la fois de l'initiation et du maintien de la tumeur mais également de sa chimiorésistance et de la rechute tumorale après traitement. Même si la méthode d'identification sur animaux immunodéprimés est largement controversée, plusieurs méthodologies ont été développées pour isoler ces populations. Parmi elles, la culture de cellules tumorales en milieux pour cellules souches a conduit à la formation de sphères enrichies en cellules CRIM. De même, différents marqueurs de cellules CRIM ont été identifiés. Nous nous sommes particulièrement intéressés au marqueur ABCB5 pour sa double implication potentielle dans le caractère initiateur de tumeur et son appartenance à la famille des transporteurs ABC, acteurs identifiés de la chimiorésistance.

1 LES LIGNEES CELLULAIRES ETABLIES DE MELANOME

Historiquement, les lignées de mélanome ont été les premiers modèles *in vitro* développés. Elles sont encore aujourd'hui des modèles très utilisés. Dans cette étude, un panel de plusieurs lignées a été utilisé et nous avons vu que les lignées de mélanomes en culture ne sont pas plus résistantes que des lignées établies à partir d'autres types cancéreux. Or les données cliniques montrent que le mélanome est particulièrement chimiorésistant comme en atteste la comparaison avec les cancers colo-rectaux qui, à un stade d'avancement équivalent, répondent d'avantage à la chimiothérapie avec environ 60% de réponse contre moins de 20% dans le cas du mélanome.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'expression de plusieurs transporteurs ABC dans ce panel de lignées de mélanomes. ABCB1, classiquement impliqué dans la chimiorésistance des cancers, n'est que très peu présent et ABCC1 et ABCG2 sont exprimés de façon très hétérogène selon les lignées. Nous nous sommes également intéressés au transporteur ABCB5, qui malgré une caractérisation encore incomplète apparaît comme un acteur potentiel de la résistance du mélanome dans la littérature. Cependant, si son expression apparaît comme préférentielle des mélanocytes et mélanomes, elle est également très variable selon les lignées. Le cas du couple de lignée WM-266-4/WM-115 est particulièrement intéressant puisque nous avons noté que l'expression d'ABCB5 est moins importante dans la lignée issue d'un mélanome primaire (WM-115) par rapport à la lignée dérivée d'une métastase du même patient (WM-266-4). Ces observations sont en accord avec les données de la littérature montrant que l'expression d'ABCB5 est corrélée positivement au stade d'avancement du mélanome.

Le modèle des lignées de mélanome comporte certains points faibles. Tout d'abord, les informations sur l'historique des patients dont elles dérivent sont pour la plupart incomplètes. Il faut également tenir compte du fait que ces lignées ont pour la grande majorité dérivé par rapport aux caractéristiques initiales de la tumeur du patient. De plus, les lignées établies sont cultivées de façon adhérente en deux dimensions, ce qui ne permet en aucun cas de refléter la structure en trois dimensions et l'architecture caractéristique d'une tumeur telle qu'on la retrouve chez les patients.

2 LES MELANOSPHERES : UN NOUVEAU MODELE *IN VITRO* DU MELANOME

2.1 Les mélanosphères ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de la résistance du mélanome

Dans un second temps des modèles en trois dimensions ont été développés dans le but de reproduire la morphologie compacte d'une tumeur et de se rapprocher des conditions cliniques. Ainsi des modèles de sphéroïdes ont notamment été élaborés. Dans cette étude, nous avons travaillé sur un modèle de sphères appelées mélanosphères par analogie à des structures similaires développées dans d'autres types de cancers, avec les neurosphères pour les cancers du cerveau (Singh et al. 2004), les mamosphères pour les cancers du sein (Dontu et al. 2003 ; Grimshaw et al. 2008), les prostosphères pour les cancers de la prostate (Wang 2009) et plus récemment les mélanosphères pour le mélanome (Fang et al. 2005; Perego et al. 2010). Les modèles sphéroïdes et mélanosphères divergent notamment par le type d'induction permettant d'obtenir ces deux structures. Ainsi, si les sphéroïdes sont des structures forcées mécaniquement, les mélanosphères sont, quant à elles, le résultat d'une culture en milieu particulier. Cependant, les modèles sphéroïdes et mélanosphères présentent tous deux l'inconvénient de ne pas être applicables à toutes les lignées de mélanome puisque les lignées SK-MEL-28 et A-375, par exemple, n'ont la capacité de former ni des sphéroïdes ni des mélanosphères, sans que nous puissions en expliquer les raisons.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la résistance comparée des différents modèles *in vitro* de mélanomes à notre disposition, à savoir la culture en monocouche, la culture en sphéroïdes et la culture en mélanosphères. Nous avons observé que les mélanosphères et les sphéroïdes sont systématiquement plus résistants que les cultures adhérentes. L'hypothèse généralement admise postule que cette différence de résistance est due à leur structure tridimensionnelle limitant le contact des cellules avec les composés cytotoxiques. Dans le cas des mélanosphères, cette structure en trois dimensions est plus petite que celle des sphéroïdes et devrait donc être plus sensible à l'action des agents anti-cancéreux. Pourtant les mélanosphères semblent autant résistants, voire dans certains cas, plus résistants que les sphéroïdes ce qui suggère l'intervention d'un autre mécanisme. Il faut tout de même noter que, d'un point de vue technique, la comparaison entre les différents modèles ne tient compte ni de la différence de densité cellulaire ni du temps de doublement.

Pourtant, ces paramètres sont d'une grande importance dans l'évaluation de l'IC₅₀ par technique de dosage d'ATP. Ce type de biais expérimentaux pourrait être évité par des approches de clonogénie après traitement cytototoxique. Il convient de noter que la vinorelbine et la camptothécine sont des substrats bien identifiés d'ABCB1 et que l'augmentation très importante d'ABCB1 dans les mélanosphères de la lignée WM-266-4 est corrélée à la très forte résistance à ce composé notée précédemment dans ce modèle. Ces hypothèses pourraient être vérifiées par des expériences d'inhibition d'ABCB1 soit par inhibiteurs pharmacologiques de type vérapamil soit par extinction siRNA.

2.2 La population CRIM est-elle enrichie dans les mélanosphères ?

Le modèle des mélanosphères rappelle des sphères déjà décrites dans le cadre de recherches sur des cellules souches somatiques et utilisées pour préserver un état indifférencié des cultures (Wong et al. 2006). Cela a ensuite été étendu à plusieurs pathologies cancéreuses et la relation entre la formation de ces structures et un enrichissement en cellules initiatrices de tumeurs a été établi. Nous avons donc cherché à savoir si le modèle des mélanosphères était enrichi en cellules CRIM.

De façon générale, le milieu de culture permettant l'induction de ce type de structure est très variable et chaque étude fait référence à un milieu différent (Fang et al. 2005 ; Perego et al. 2010), ce qui entraîne un manque d'uniformité et empêche une comparaison stricte des modèles. Dans notre cas, le milieu de culture utilisé pour la formation des mélanosphères est le milieu Melanocyte Growth Medium M2 supplémenté avec le Supplement Mix de PromoCell. Il s'agit d'un milieu sans sérum complété par un cocktail de facteurs de croissance destiné à la culture des mélanocytes. Les milieux sans sérum sont fréquemment utilisés pour le maintien de cellules indifférenciées. Il faut noter qu'il s'agit d'un milieu de croissance et non d'un milieu de différenciation. On ne peut cependant pas exclure la possibilité que ce milieu contenant des facteurs de croissances spécifiques des mélanocytes induise une différenciation des cellules et non le maintien d'un caractère indifférencié. De plus, nous avons également obtenu des structures morphologiquement similaires avec des milieux contenant du LIF ou un mélange insuline/transferrine connus dans le cas du premier pour favoriser le caractère indifférencié et dans le cas du second pour favoriser la différenciation.

Afin de savoir si les mélanosphères étaient enrichies en cellules CRIM, nous avons utilisé le modèle classique de la xénogreffe sur souris immuno-déprimées pour statuer sur le caractère initiateur de tumeurs des deux modèles de culture monocouche et mélanosphères. Les résultats obtenus montrent que, dans nos mains, les mélanosphères ne sont pas plus tumorigènes que les cellules adhérentes. Cependant, cette expérience n'a été réalisée qu'une fois et les conditions expérimentales utilisées présentent des biais bien identifiés tel que la différence de viabilité entre la suspension issue des cultures adhérentes et celle issues des mélanosphères pouvant entraîner des différences importantes au niveau de la réponse immunitaire des souris contre la xénogreffe et donc fausser les résultats. De plus la souche de souris Swiss-nude utilisée diffère de la souche NOD/SCID classiquement utilisée pour l'identification des cellules initiatrices de tumeurs. Pour ces raisons, cette première étude ne nous permet pas de conclure sur l'enrichissement en cellules CRIM de ce modèle.

Cette étude nous apprend donc que le modèle des mélanosphères apparaît plus résistant que leur équivalent en monocouche et parfois de leur équivalent sphéroïde. Ces structures semblent donc plus représentatives de la chimiorésistance du mélanome. L'enrichissement des mélanosphères en cellules CRIM reste quant à lui à explorer. Sous couvert d'une meilleure caractérisation de ce modèle, il pourrait permettre d'utiliser les mélanosphères pour modéliser cette sous-population, ce qui viendrait s'ajouter à la caractéristique de chimiorésistance. Moyennant un recul expérimental plus important, les mélanosphères pourraient constituer un modèle pharmacologique innovant pour le développement et le criblage de nouvelles molécules anti-mélanome en tenant compte à la fois de la composante de chimiorésistance et de la présence de la sous-population CRIM.

3 LA SOUS-POPULATION CRIM IDENTIFIEE ABCB5 POSSEDE-T-ELLE DES CARACTERISTIQUES DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES ?

Nous venons de voir que certaines études utilisent des propriétés fonctionnelles telles que la capacité à former des sphères pour définir une sous-population cellulaire présentant des propriétés particulières au sein de la masse tumorale. De nombreux travaux se sont également focalisés sur l'expression de marqueurs spécifiques. Dans ce contexte, le marqueur ABCB5 apparaît dans la littérature comme un marqueur potentiel de la population CRIM. Nous avons donc focalisé notre projet sur ABCB5 et cherché à clarifier le concept de cellules CRIM basé sur l'expression de ce transporteur.

Tout d'abord, ABCB5 est exprimé de façon hétérogène au sein d'une tumeur de mélanome. Cette caractéristique a été validée par plusieurs études (Frank et al. 2005; Keshet et al. 2008; Schatton et al. 2008) à la fois pour des lignées établies de mélanome, ainsi que pour des tumeurs de patients. Dans ce travail de thèse, nous avons confirmé cette propriété avec deux anticorps différents sur plusieurs lignées de mélanomes ainsi que sur des échantillons de patients *ex vivo*. L'ensemble de ces données permet donc de conclure que la présence d'ABCB5 définit une sous-population tumorale minoritaire.

Des études de co-marquages ont également été réalisées pour montrer que l'expression d'ABCB5 est reliée à d'autres marqueurs connus de cellules CRIM identifiés lors de l'étude des cellules souches hématopoïétiques tels que CD133, CD20 (Monzani et al. 2007; Rappa et al. 2008a ; Schmidt et al. 2011) ou plus spécifiques de la lignée de différenciation de la crête neurale dont sont issus les mélanocytes tels que Nestin ou TIE-1 (Schatton et al. 2008). Il faut noter que les co-marquages utilisés ne permettent jamais un recouvrement total des différentes populations identifiées par les marqueurs. Les biologistes ont donc jusqu'à maintenant été dans l'incapacité de démontrer l'existence d'un marqueur unique de cellules CRIM. Cependant, il existe une grande hétérogénéité biologique entre les différents types de mélanome, autant par leur mode de développement, la nature des mutations observées au niveau moléculaire que par les sites métastatiques. Il est donc difficile d'imaginer qu'un seul type de cellules CRIM puisse être à l'origine d'une diversité si importante (Rambow and Larue 2010). Rechercher un marqueur unique permettant de définir de façon systématique les populations CRIM semble difficilement réalisable.

La définition d'une population CRIM passe classiquement par l'évaluation de sa capacité à initier des tumeurs *in vivo*. Ce travail a été entrepris dans le cas d'ABCB5 avec des résultats contradictoires suivant les publications et les modèles expérimentaux utilisés. Ainsi, une première étude avait montré grâce à un modèle de souris NOD/SCID que les cellules exprimant ABCB5 étaient plus tumorigènes que les cellules ne l'exprimant pas ou des cellules non triées (Schatton et al. 2008). Un second modèle de souris NOD/SCID IL2 γ^{null} plus immunodéprimées utilisant de plus un support de matrigel pour la prise tumorale, n'avait pas permis de montrer de différence de pouvoirs tumorigènes (Quintana et al. 2008; Quintana et al. 2010). L'utilisation du support de matrigel lors de la prise de greffe permet de réduire la variabilité quant à l'attachement des cellules au support et donc de focaliser sur la capacité des cellules à initier une tumeur. Enfin, une dernière étude avait montré que le différentiel de prise tumorale était visible entre les cellules exprimant ou pas ABCB5 sur ce même modèle de souris NOD/SCID IL2 γ^{null} (Frank et al. 2011). Dans notre étude, nous avons réalisé une expérience similaire dans laquelle des cellules de mélanome triées sur le critère de l'expression d'ABCB5 ont été greffées dans un modèle de souris Swiss Nude moins immunodéprimées que celles utilisées dans l'ensemble des études précédentes. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de différence de prise tumorale entre les différentes fractions de tri mais nous avons également eu des difficultés à visualiser l'effet de la dilution des cellules lors de la prise de greffe. Pour améliorer ces conditions, l'utilisation de matrigel pourrait permettre d'uniformiser les conditions d'attachement initial. L'ensemble de ces données illustre la difficulté de démontrer le caractère initiateur de tumeur et la fragilité de ce concept. Les variations observées en fonction de la souche de souris utilisée suggèrent que la capacité à initier des tumeurs est le reflet de la capacité des cellules à s'adapter à un environnement étranger et non de leur capacité à mimer des caractéristiques "souche".

Outre le problème des modèles utilisés, plusieurs autres aspects sont également discutés. Le premier d'entre eux concerne la rareté des cellules CRIM. Suivant le modèle des cellules souches somatiques ainsi que des cellules souches leucémiques, les cellules CRIM ont longtemps été considérées comme une sous-population très peu abondante. Suivant les conditions expérimentales, la proportion de cellules CRIM estimée par les mêmes modèles de greffe sur animaux immunodéprimés déjà évoqués varie entre 0,0001% et plus de 40% de la population totale (Quintana et al. 2008; Quintana et al. 2010 ; Boiko et al. 2010). Ces variations sont hautement dépendantes du statut immunitaire des souches de souris et remettent en question le dogme de la rareté des cellules CRIM énoncé sur la base des cellules souches somatiques.

Les cellules souches somatiques suivent une hiérarchie bien déterminée au cours de leur différenciation. Au sein des tumeurs, ce système hiérarchique ne semble pas être respecté notamment à cause de l'instabilité génétique importante des cellules cancéreuses. Les cellules tumorales font en effet preuve d'une grande plasticité et il est même envisagé que les cellules CRIM dérivent directement de la dé-différentiation de mélanocytes. La capacité des cellules exprimant ABCB5 à re-crée une population hétérogène après tri a été analysée. Les premières études publiées à ce sujet avaient montré que les cellules exprimant ABCB5 étaient capables de reformer une population hétérogène pour l'expression d'ABCB5 dans des proportions proches de celles obtenues avant le tri *in vitro* et *in vivo*. Au contraire, les cellules n'exprimant pas ABCB5 ne donnaient lieu qu'à une descendance négative pour l'expression d'ABCB5 (Schatton et al. 2008). Les auteurs en avaient conclu que les cellules exprimant ABCB5 avaient un pouvoir de différenciation supérieur à celui des cellules n'exprimant pas ABCB5. Dans notre étude, nous avons confirmé la propriété des cellules exprimant ABCB5 à redonner une population hétérogène *in vitro* après tri cellulaire sur la base de l'expression d'ABCB5. Au cours d'une expérience unique menée par xénogreffe après tri cellulaire, cette caractéristique a également été validée *in vivo*. Cependant, nous avons également observé que la population triée négative pour ABCB5 était également capable de reformer une population hétérogène. Si cette observation n'est pas la conséquence d'une contamination de la fraction négative par des cellules positives, alors elle conduirait à l'invalidation du concept.

La capacité d'auto-renouvellement est l'une des caractéristiques principales des cellules souches somatiques. Afin de montrer les capacités d'auto-renouvellement *in vivo* des cellules exprimant ABCB5, des expériences de passages répétés *in vivo* ont été réalisées mais dans la limite de deux passages successifs (Schatton et al. 2008), ce qui ne reflète pas la capacité d'auto-renouvellement à long-terme.

Enfin, le modèle des cellules souches somatiques stipule que les cellules souches sont des cellules quiescentes ou proliférant très lentement et là encore les études divergent lorsque cette caractéristique est étudiée. Cependant, il faut noter que même dans des conditions physiologiques, les cellules souches peuvent sortir de leur état de quiescence en réponse à des stimuli environnementaux. Dans le cas d'ABCB5, nous n'avons pas noté de différences de prolifération entre les différentes populations.

La littérature apporte donc plusieurs arguments permettant de définir les cellules exprimant ABCB5 comme cellules CRIM. Dans nos travaux, nous n'avons pas reproduit l'ensemble de ces expériences. Cependant malgré la fragilité du concept et le manque de

recul, il semble clair que ces cellules présentent dans certains modèles des propriétés particulières permettant de les distinguer du reste de la population et justifiant de leur intérêt. Néanmoins, il manque encore différents éléments avant de pouvoir conclure que les cellules CRIM identifiées par l'expression d'ABCB5 sont des cellules souches cancéreuses et la question se pose donc de savoir jusqu'où le parallèle entre les cellules CRIM et les cellules souches doit être poussé, particulièrement dans le cas du mélanome (Girouard and Murphy 2011). De plus si les rôles d'ABCB1 et d'ABCG2 ont d'ores et déjà été explorés dans le maintien des cellules souches somatiques, celui d'ABCB5 dans les cellules souches adultes de mélanocytes ou dans les cellules souches de la crête neurale n'a pas encore été abordé et constitue une large voie d'exploration possible.

ABCB5 EST-IL IMPLIQUE DANS LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME ?

Nous avons émis l'hypothèse que le transporteur ABCB5 pouvait avoir un rôle dans la chimiorésistance du mélanome. En supposant que ce transporteur pouvait avoir une fonctionnalité d'efflux, ce qui n'est à ce jour pas clairement démontré, nous avons cherché à savoir si les cellules exprimant ABCB5 ne pouvaient pas avoir un avantage de survie par rapport au reste de la population cellulaire. Nous avons donc étudié la sensibilité de la sous-population exprimant ABCB5 par rapport à la population totale en réponse à différents traitements anti-mélanomes ou plus largement anti-cancéreux.

1 LES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 SONT IMPLIQUEES DANS LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME

Nous avons montré *in vivo* sur un modèle de xénogreffe que les tumeurs traitées au temozolomide, un agent alkylant utilisé en thérapie anti-mélanome, étaient enrichies en cellules exprimant ABCB5 et que les cellules positives exprimaient davantage de protéine ABCB5 à leur surface. Cette observation a été confirmée *in vitro* sur plusieurs lignées en réponse à la dacarbazine, puis étendue à différents agents anti-cancéreux issus de différentes classes pharmacologiques. Il convient également de revenir sur l'importance des mêmes résultats obtenus avec le vemurafenib à la fois sur des lignées et sur des échantillons de patients *ex vivo*, ce composé ayant montré pour la première fois en clinique une efficacité avérée dans le traitement du mélanome métastatique.

1.1 Les cellules exprimant ABCB5 ont-elles un avantage de survie face aux thérapies anti-mélanome ?

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes cellulaires conduisant à ces observations. Nous avons tout d'abord supposé que l'augmentation visualisée pouvait être la conséquence d'une survie sélective des cellules exprimant ABCB5 par rapport au reste de la

population. Afin de confirmer cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à la prolifération des cellules résistantes après traitement. Nous avons dans un premier temps mené des expériences d'analyse du cycle cellulaire après traitement et montré que l'ensemble de la population présentait une modification du cycle cellulaire par rapport aux cellules non traitées (non montré). Cependant nous nous sommes confrontés à des difficultés techniques ne permettant pas une distinction satisfaisante entre les cellules exprimant ou non ABCB5. Nous nous sommes alors tournés vers des expériences de dilution du CFSE et nous avons montré que malgré un ralentissement de la prolifération, les cellules survivantes (dont les cellules exprimant ABCB5) continuent à se diviser et à entretenir une population survivante. Aucune différence n'a, par contre, été visualisée entre les cellules exprimant ABCB5 et le reste des cellules survivantes. ABCB5 ne semble donc pas être le seul mécanisme de résistance.

Nous avons également réalisé un tri cellulaire basé sur l'expression d'ABCB5 afin de soumettre séparément au traitement des cellules exprimant ou non ABCB5. Nous n'avons noté aucune différence en termes de résistance entre les fractions exprimant ABCB5 et les fractions ne l'exprimant pas. Néanmoins, cette approche expérimentale ne paraît pas adaptée en raison de différents biais techniques identifiés. Ainsi, nous avons noté la présence de cellules résiduelles exprimant ABCB5 dans la fraction négative après tri et leur augmentation lors de la remise en culture et du traitement. De plus, nous avons réalisé un tri positif et les cellules exprimant ABCB5 triées positives sont donc porteuses de l'anticorps qui persiste plusieurs jours après le marquage. La présence de l'anticorps sur la protéine ABCB5 pourrait entraîner un blocage de la pompe par l'anticorps. L'ensemble de ces données nous a permis de conclure que le nombre de cellules exprimant une protéine ABCB5 non liée à l'anticorps était donc identique entre les différentes fractions au moment du test de cytotoxicité, rendant impossible la détection d'une survie différentielle. Pour contourner ce problème, il nous faudrait envisager un tri négatif (en caractérisant un second marqueur) ou dissocier l'anticorps après le tri et avant le traitement, cependant il s'agirait d'un stress supplémentaire pour les cellules qui ont déjà subi celui du tri par cytométrie en flux. De plus, le tri cellulaire devra être plus stringent afin d'améliorer la pureté de la fraction négative.

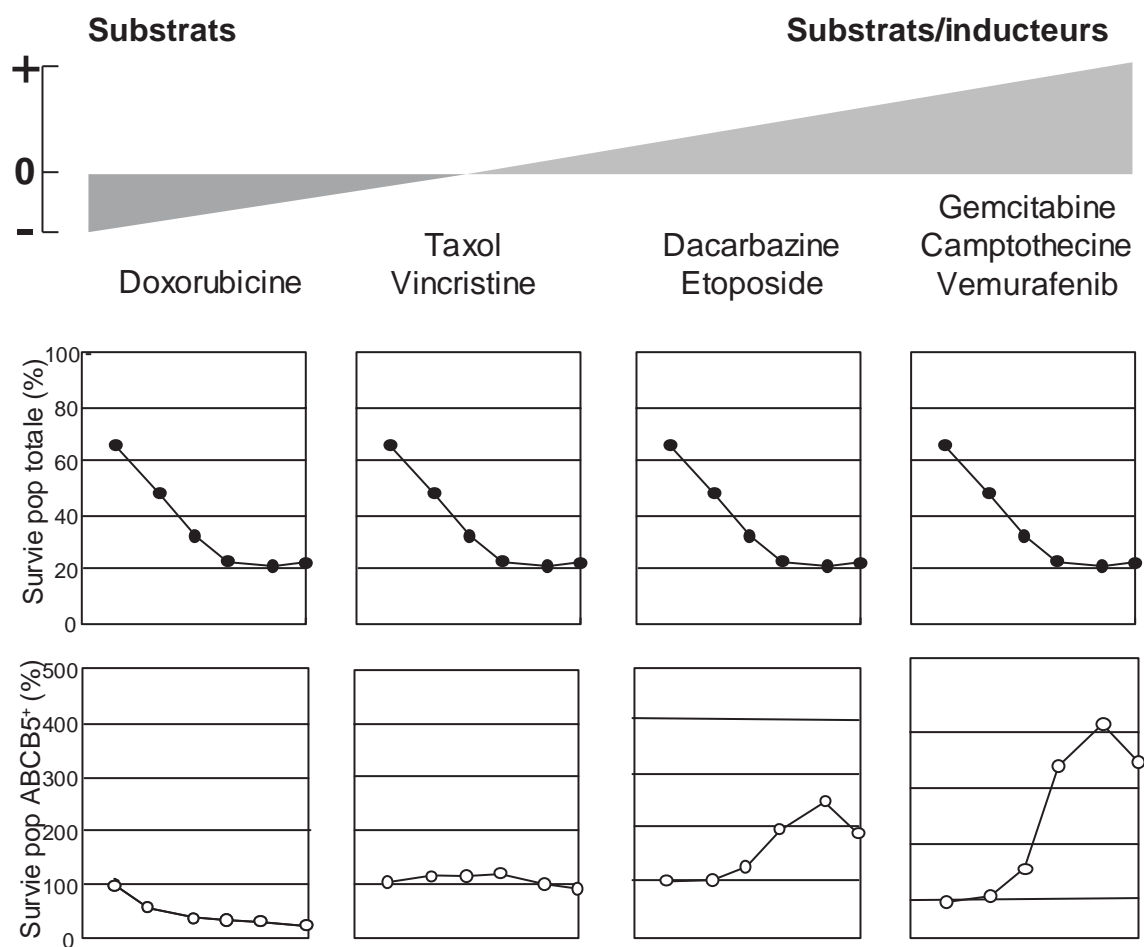


Figure 57 : Modèle d'analyse des profils de réponse aux agents anti-cancéreux

Les différents agents anti-cancéreux ont été triés suivant la réponse des cellules exprimant ABCB5. La première catégorie représentée par la doxorubicine ne permet pas de visualiser une survie préférentielle des cellules exprimant ABCB5 sauf pour les doses élevées et pourrait correspondre à des substrats de faible affinité. La deuxième catégorie représentée par le taxol et la vincristine permet de mettre en évidence un maintien de la population exprimant ABCB5 et pourrait correspondre à des substrats de meilleure affinité. Enfin les catégories 3 et 4 correspondent à des drogues telles que la dacarbazine ou le vemurafenib pour lesquels la population exprimant ABCB5 est augmentée sous traitement. Ces deux catégories pourraient ainsi correspondre à des composés substrats et/ou inducteurs, le niveau d'augmentation ne pouvant pas être expliqué par la seule prolifération de ces cellules.

1.1 Les cellules exprimant ABCB5 sont-elles induites face aux thérapies anti-mélanome ?

Nous avons également envisagé la possibilité que l'augmentation des cellules exprimant ABCB5 visualisée après traitement ne soit pas la conséquence d'une survie sélective mais d'une induction d'ABCB5 dans des cellules qui ne l'exprimaient pas avant traitement. Cette hypothèse est étayée par les observations effectuées après traitement au cycloheximide ou à la Brefeldine A montrant une induction de la synthèse protéique d'ABCB5 ainsi qu'une mobilisation à la membrane. Dans le cadre de cette hypothèse, il nous faut faire la distinction entre les composés potentiellement substrats et les composés inducteurs. Il faut noter que la notion de substrat fait référence à l'hypothèse que la protéine ABCB5 ait un rôle fonctionnel en tant que transporteur. Les composés substrats entraîneraient une augmentation des cellules ABCB5 par un processus de survie sélective et donc de sélection. Les composés inducteurs entraîneraient quant à eux une augmentation des cellules exprimant ABCB5 via une néo-synthèse de la protéine à la fois dans les cellules l'exprimant déjà (augmentation du niveau d'expression par cellules) et dans les cellules qui ne l'exprimaient pas avant traitement (augmentation du nombre de cellules positives). Une substance peut-être substrat sans être inducteur et inversement. Les différences de profil de réponse des différents composés testés pourraient être le reflet de la nature de ces composés (figure 57).

L'étude d'une induction possible d'ABCB5 nous a également amené à poser la question de la régulation de l'expression d'ABCB5. La première hypothèse se base sur une régulation de type épigénétique par méthylation d'îlots CpG au niveau de son promoteur, ou par l'action d'histones déacétylases (HDAC) comme c'est le cas pour ABCB1 (Baker et al. 2004). Nous avons ainsi réalisé une étude préliminaire de la séquence du promoteur d'ABCB5 qui n'a révélée aucun îlot CpG. De plus un traitement par la 5-azacytidine, composé connu pour inhiber l'action des méthyltransférases, n'a pas conduit à la modification de l'expression d'ABCB5. De même, un traitement par la trichostatine A, un inhibiteur des HDAC, ne permet pas de modifier l'expression d'ABCB5. La seconde hypothèse envisage une régulation de l'expression par des cassettes de transcription répondant aux ROS (Reactive Oxygen Species) comme cela a été décrit dans le cas d'ABCB1 (pour revues Sukhai et al. 2000; Callaghan et al. 2008). Nous avons conduit en ce sens une seule expérience préliminaire pour ABCB5 par traitement H_2O_2 , mais aucun résultat probant n'a été observé.

2 LA PROTEINE ABCB5 EST-ELLE IMPLIQUEE DANS LA CHIMIORESISTANCE DU MELANOME ?

2.1 ABCB5 a-t-il une fonction d'efflux dans le phénotype observé ?

Sur le plan phylogénétique, ABCB5 possède une séquence très proche de celle des transporteurs ABCB1, ABCB4 et ABCB11. Ces trois transporteurs sont impliqués dans l'efflux de xénobiotiques et dans la chimiorésistance de certains cancers. Il serait donc logique qu'ABCB5 présente une fonction similaire. De plus, les analyses structurales prédisent à ABCB5 des familles de substrats similaires à celles d'ABCB1, ABCB4 et ABCB11.

Une équipe américaine a publié plusieurs études permettant de proposer qu'ABCB5 pourrait avoir un rôle fonctionnel en tant que transporteur dans l'efflux de doxorubicine et de rhodamine (Frank et al. 2003; Frank et al. 2005). De plus un effet sensibilisateur d'un anticorps anti-ABCB5 avait été visualisé en réponse à un traitement à la doxorubicine (Frank et al. 2005). Plus récemment, des shRNA ciblant ABCB5 dans des lignées de cancer du côlon ont été utilisés pour démontrer un rôle du transporteur dans la résistance au 5-Fluoro-uracile (Wilson et al. 2011).

Au cours de notre propre étude, nous avons également cherché à impliquer fonctionnellement la protéine ABCB5 dans le phénotype observé. Ainsi, j'ai réalisé un essai d'extinction de l'expression d'ABCB5 par siRNA. Cette approche n'a pas permis de mettre en évidence une différence de sensibilité à des composés anti-mélanome en absence d'ABCB5. Il faut cependant rappeler que l'extinction de la protéine n'est pas totale après transfection siRNA. Nous avons également exploité un système de sur-expression de la protéine ABCB5 isoforme 2 mis en place au sein du laboratoire. Ainsi, des expériences de sur-expression après transfection transitoire ainsi que des clones stables sur-exprimant l'isoforme 2 d'ABCB5 ont été réalisées et ont conduit aux mêmes conclusions que les essais siRNA. Des expériences d'efflux de la rhodamine par les clones sur-expresseurs ont également été réalisées mais aucune différence d'efflux de la rhodamine n'a été visualisée pour les clones sur-exprimant ABCB5 isoforme 2 par rapport au clone vide ou à la lignée sauvage laissant supposer que soit la rhodamine n'est pas substrat soit que la protéine ABCB5 isoforme 2 sur-exprimée n'est pas fonctionnelle. Il faut rappeler que ces études de sur-expression sont focalisées sur l'isoforme 2 du transporteur ABCB5. Même si les études de Western blot après traitement et de PCR quantitative viennent conforter ce choix, nous ne disposons d'aucune certitude que les études

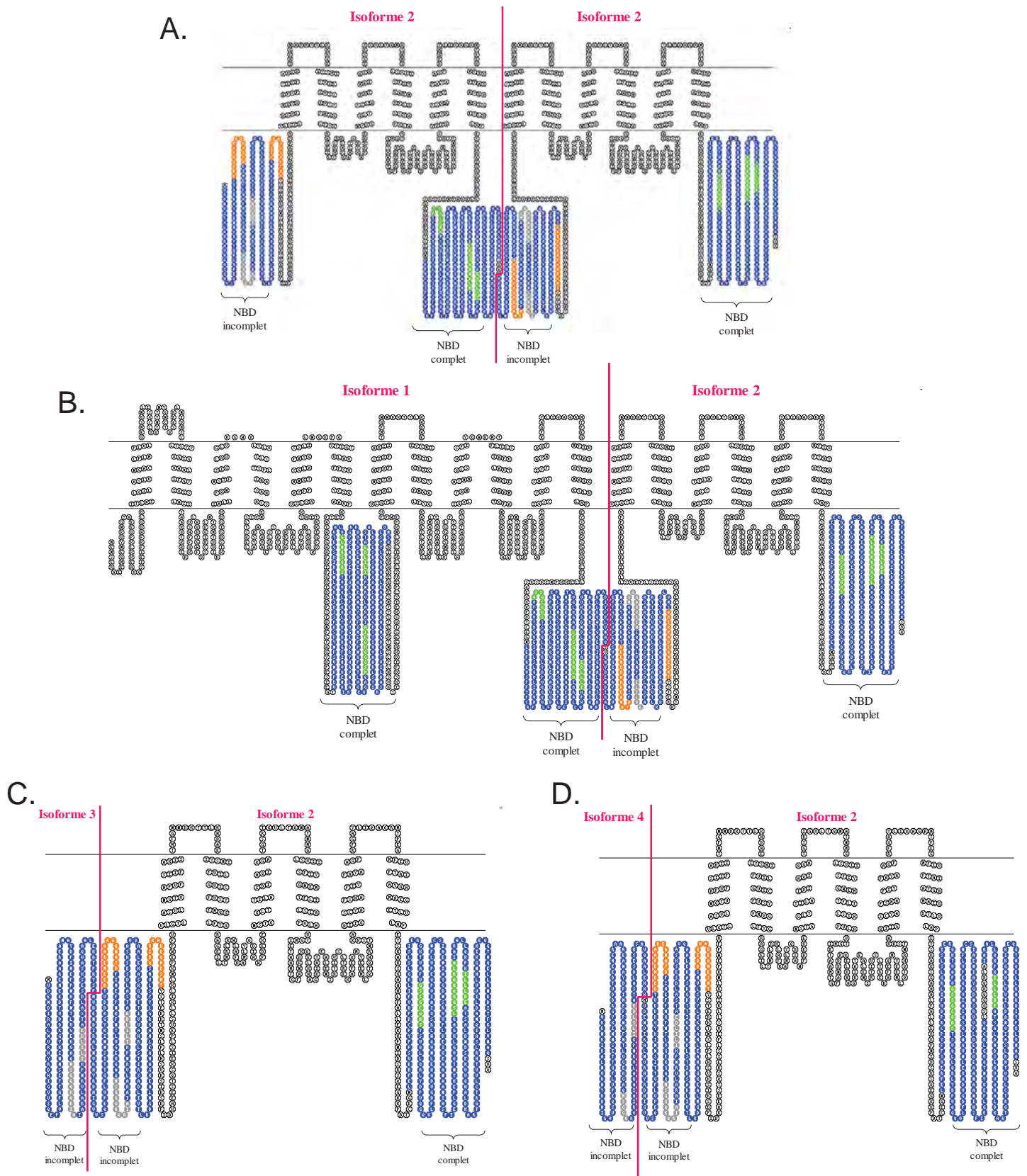


Figure 58 : Modèles de dimérisation de l'isoforme 2 d'ABCB5

L'isoforme 2 d'ABCB5 ne permet pas la formation d'une protéine capable d'un point de vue structural de pouvoir hydrolyser l'ATP et donc transporter des composés. Les domaines NBD sont en bleu, les domaines coiled-coil en orange, les Walker A et B et le motif C en vert lorsque le domaine NBD est complet et en gris lorsqu'il est incomplet. Des modèles de dimérisation ont été envisagés pour concevoir des protéines à deux domaines NBD fonctionnels. Le premier modèle (**A**) propose une homodimérisation de l'isoforme 2. Le deuxième modèle (**B**) propose une hétérodimérisation de l'isoforme 2 avec l'isoforme 1. Les derniers modèles (**C** et **D**) propose une hétérodimérisation avec les isoformes 3 et 4 respectivement.

précédemment menées ne mettaient pas en jeu une isoforme différente. De même, il est envisageable que le tag Flag exprimé en N-terminal de la protéine ABCB5 puisse gêner son fonctionnement normal. Enfin, si les cellules A-375 ont été choisies pour leur niveau basal d'expression d'ABCB5 à la membrane très faible, il est impossible d'exclure que cette lignée soit dans l'incapacité d'exprimer la protéine sur-exprimée et de l'exporter correctement à la membrane. A ce jour, il apparaît donc nécessaire de poursuivre les études sur la fonction d'efflux des différentes isoformes afin de pouvoir conclure sur la fonctionnalité de ces isoformes ainsi que sur les substrats spécifiques du transporteur ABCB5. Cela pourrait être envisagé sous la forme d'expériences d'efflux réalisées sur des modèles de membrane ou de vésicules sur-exprimant les différentes isoformes d'ABCB5.

2.2 Quelle isoforme pourrait être impliquée d'un point de vue structural ?

Les spéculations autour du rôle fonctionnel d'ABCB5 en tant que transporteur sont également associées aux questions encore non résolues portant sur le rôle respectif des différentes isoformes de cette protéine. En effet les hypothèses sur la fonction d'efflux se basent sur l'homologie de structure tridimensionnelle entre ABCB1 et la forme longue d'ABCB5 (isoforme 1). Or l'isoforme 1 n'a été détectée que dans les testicules. Au niveau des mélanomes et mélanocytes, c'est l'isoforme 2 qui est majoritaire. Pourtant, l'isoforme 2 possède une structure primaire non conventionnelle et unique dans la famille des transporteurs ABC. Sans deux domaines NBDs complets, la dimérisation des domaines NBD et la formation de la poche ATP est difficilement envisageable et il n'est pas concevable d'imaginer une fonction d'efflux sans hydrolyse de l'ATP. Il est cependant envisageable que l'isoforme 2 puisse se dimériser comme les héli-transporteurs soit sous la forme d'un homodimère à partir des structures coil-coiled identifiées (Moitra et al. 2011), soit sous la forme d'un hétérodimère avec l'isoforme 1 ou un autre partenaire non identifié. La formation d'un hétérodimère entre l'isoforme 2 et les isoformes 3 ou 4 ne permettrait pas la formation d'un deuxième domaine NBD complet et ne conduirait pas à une protéine fonctionnelle (figure 58). Cependant, il pourrait également être envisagé la possibilité que les isoformes 3 et 4 servent de dominants négatifs à la dimérisation de l'isoforme 2, permettant ainsi une régulation plus fine de son expression et de sa fonction. Cependant aucune donnée expérimentale ne vient étayer de telles hypothèses. Il a également été suggéré que l'isoforme 1 soit la seule isoforme fonctionnelle (Gillet et al. 2009), ce qui pourrait correspondre à l'augmentation sous traitement que nous avons visualisée par PCR quantitative mais qui

n'est pas confirmée au niveau protéique par Western Blot. L'isoforme 2 ne serait alors absolument pas reliée à une fonction de transporteur. Dans ce cas, le rôle de l'isoforme 2 reste à définir et il serait nécessaire de savoir si cette isoforme joue un rôle de régulation de l'expression de l'isoforme 1 ou un rôle fonctionnel autre que celui de transporteur.

2.3 ABCB5 peut-il avoir un rôle fonctionnel autre que l'efflux ?

La protéine ABCB1 a été très étudiée pour son rôle de transporteur de composés xénobiotiques et anti-cancéreux. Cependant, d'autres fonctions apparaissent depuis quelques années. Il a été montré que la protéine ABCB1 participait à la régulation des voies apoptiques (pour revue Sarkadi et al. 2006). ABCB1 a également été impliquée dans le phénotype invasif de cellules cancéreuses puisqu'un travail a montré qu'après sélection de lignées de mélanome sur-exprimant ABCB1 à la suite d'un traitement prolongé à l'adriamycine, les lignées ayant une plus grande expression d'ABCB1 possédaient également un pouvoir invasif plus important de façon corrélée à une co-localisation d'ABCB1 avec la protéine d'adhésion CD44 (Colone et al. 2008). Dans le cas d'ABCB5, de tels rôles pourraient être envisagés et des données préliminaires obtenues au laboratoire étayent cette hypothèse. En effet, les clones A-375 sur-exprimant ABCB5 de façon stable ont montré une capacité à migrer et à envahir plus grande que la lignée A-375 sauvage dans des expériences en chambres de Boyden. Des expériences d'extinction siRNA ABCB5 permettraient de valider le rôle d'ABCB5 dans le phénomène de migration.

Au cours de mon travail, j'ai également observé une augmentation des cellules exprimant ABCB5 après traitement à des rayonnements ultraviolets. Cette propriété avait déjà été décrite dans le cas d'ABCB1 (Ohga et al. 1998). Aucune donnée n'est disponible pour expliquer le rôle d'un transporteur ABC face à ce type de cytotoxicité. Cependant, il faut rappeler que l'expression d'ABCB5 est préférentielle des tissus sains contenant des cellules pigmentées. Or ces cellules sont particulièrement exposées aux rayonnements UVs. On peut donc envisager l'hypothèse que la résistance aux rayonnements UVs via un mécanisme non identifié puisse constituer un rôle physiologique d'ABCB5.

2.4 ABCB5 est-il un transporteur vésiculaire ?

Au cours de l'introduction bibliographique, nous avons vu que les mélanosomes sont potentiellement impliqués dans la chimiorésistance du mélanome. En effet, la cellule de

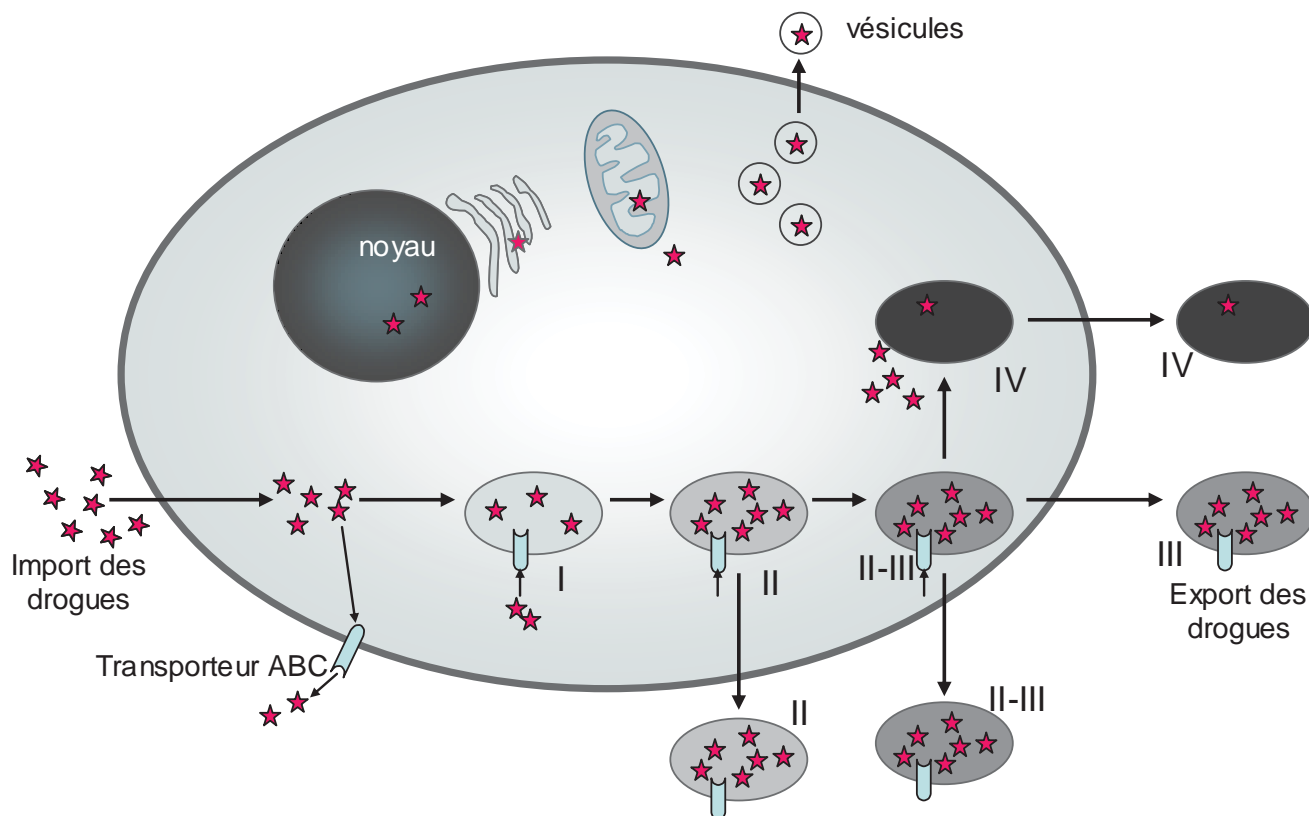


Figure 59 : Modèle de l'implication des transporteurs ABC dans la voie de la mélanogénèse

Un modèle a récemment été proposé pour expliquer l'implication conjointe des transporteurs de type ABC et des mélanosomes dans la résistance du mélanome. Il permet d'expliquer l'entrée des composés toxiques à l'intérieur des vésicules de type mélanosomes. Ce modèle, tiré de Chen et al. 2009b est présenté dans le schéma.

mélanome pourrait résister aux composés cytotoxiques en les piégeant dans ce compartiment sub-cellulaire au fur et à mesure du processus de maturation des mélanosomes jusqu'à l'export hors de la cellule (Chen et al. 2006a). Cependant aucune donnée n'est disponible sur le mécanisme par lequel les composés pénètrent dans ce compartiment. Une des hypothèses évoquées dans la littérature implique la présence de transporteurs ABC à la surface des mélanosomes qui efflueraient les composés du compartiment cytoplasmique vers l'intérieur des mélanosomes (Chen et al. 2009b) (figure 59). Aucun transporteur n'a jusqu'à présent été identifié à la surface des mélanosomes.

Nous avons voulu savoir si ABCB5 ne pouvait pas être localisé sur des vésicules de type mélanosomes. Plusieurs données préliminaires nous ont incité à explorer cette hypothèse. En effet, le marquage ABCB5 après traitement apparaît sous la forme de plusieurs points de focalisation fréquemment localisés au bout des dendrites des cellules de mélanome, comme c'est le cas pour la translocation des mélanosomes au moment de l'export (pour revue, Park et al. 2009). Nous avons donc essayé de préciser les structures membranaires portant ABCB5 par une approche de microscopie électronique à balayage. Nos premières données suggèrent qu'ABCB5 est localisé dans des zones très perturbées en terme de topologie et évoquant peut-être des zones de sécrétion de vésicules. Cette hypothèse devra être discutée avec des experts en microscopie électronique. De plus, après traitement au vemurafenib, une production importante de mélanine est observable en parallèle de l'enrichissement en cellules exprimant ABCB5 dans l'ensemble des lignées étudiées. Afin de vérifier cette hypothèse, un co-marquage d'ABCB5 et d'un marqueur de mélanosomes précoces HMB45 a été réalisé lors d'une étude préliminaire. Aucune co-localisation stricte entre ABCB5 et HMB45 n'a été observée. En revanche, les deux marqueurs définissent des ponctuations distinctes mais co-localisées. Nous en avons déduit qu'ABCB5 pourrait être localisé au niveau de structures vésiculaires non mélanosomes exportées hors de la cellule par des voies identiques à celles des mélanosomes. Il serait également envisageable qu'ABCB5 soit présent sur des mélanosomes à des stades de maturation antérieurs à ceux reconnus par HMB45. Afin d'éprouver ces hypothèses, il serait judicieux d'entreprendre des co-marquages avec des marqueurs de mélanosomes autres que HMB45 pour d'une part valider les observations déjà effectuées et d'autre part pour explorer la possibilité d'un co-marquage avec des mélanosomes de maturation différente. Il serait ensuite intéressant d'étendre à des marqueurs vésiculaires autres que mélanosomes pour essayer d'identifier des structures de type exosome qui co-localiseraient avec ABCB5.

Les protéines Rab sont connues pour réguler l'export vers la membrane plasmique de nombreuses protéines et organelles sub-cellulaires. C'est notamment le cas pour Rab4 et Rab14 qui interagissent avec ABCB1. Une sur-expression de Rab4 entraîne une sous-expression d'ABCB1 à la membrane et inversement dans les cellules résistantes sur-exprimant ABCB1, le niveau de Rab 4 est anormalement faible (Ferrandiz-Huertas et al. 2011). De même le transport des mélanosomes est régulé par des protéines Rab avec l'implication de Rab27a, Rab 38, Rab 32, Rab17 et Rab7 (Gomez et al. 2001; Beaumont et al. 2011). Etant donné les résultats obtenus après traitement à la Brefeldine A, il serait intéressant de creuser les mécanismes de mobilisation d'ABCB5 à la membrane plasmique. Dans ce cadre, il pourrait être envisagé de s'intéresser à la régulation de l'expression d'ABCB5 par des protéines Rab de façon combinée à la régulation des mélanosomes (ou autres vésicules) en réalisant dans un premier temps des co-localisations en immunofluorescence et dans un second temps en ayant recours à des techniques de co-immunoprécipitation pour valider la présence de protéines partenaires.

Au cours de cette étude, nous n'avons apporté aucun nouvel élément nous permettant d'impliquer fonctionnellement la protéine ABCB5 dans la résistance des cellules de mélanome. Malgré un certain nombre de biais techniques identifiés permettant de discuter les résultats nous ne pouvons pas exclure que la protéine ABCB5 n'ait aucun rôle direct. Il pourrait servir de senseur du stress pharmacologique permettant la mise en place de mécanismes cellulaires variés. Dans ce contexte il faudrait envisager que la résistance de ces cellules CRIM ne soit pas liée à la protéine ABCB5 et soit la conséquence de propriétés intrinsèques à ces cellules. Il est par exemple envisageable que ces cellules possèdent d'autres mécanismes de résistance propres comme les voies de résistance à l'apoptose, les voies de réparation de l'ADN particulièrement celle mettant en jeu la MGMT face à la dacarbazine ou au temozolomide ou encore dans le cas du vemurafenib, une sur-activation des voies de signalisation en parallèle ou en aval de BRAF. Dans cette optique, il serait intéressant de pouvoir étudier la présence de ces autres mécanismes de résistance identifiés dans l'introduction bibliographique dans les cellules exprimant ABCB5 par rapport aux cellules ne l'exprimant pas.

3 LE SUIVI DES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 PEUT-IL TROUVER DES APPLICATIONS EN CLINIQUE ?

3.1 L'augmentation du nombre de cellules exprimant ABCB5 suite au traitement pharmacologique est-elle relevante de la situation clinique ?

Dans cette étude, nous avons impliqué les cellules exprimant ABCB5 dans la résistance aux agents anti-mélanome *in vitro* et *in vivo*. Afin de compléter ces travaux, une étude clinique des patients traités au déticène et/ou au témodal s'est imposée. Cette approche a été mise en place et les résultats obtenus montrent une tendance laissant penser que l'expression d'ABCB5 peut être augmentée après traitement. Cependant, une analyse statistique est impossible en raison du nombre trop faible d'échantillons. Il faudrait donc pouvoir confirmer ces premières observations avec une cohorte de patients plus importante.

Le mode de traitement des mélanomes métastatiques en clinique risque de subir de profondes modifications dans les années à venir avec un développement croissant de ces thérapies ciblées prometteuses. Ainsi, l'analyse de patients impliqués dans des essais cliniques pour le vemurafenib pourrait être très informative surtout en regard des résultats obtenus sur la primoculture de l'échantillon de patient Mel3 après traitement au vemurafenib. Dans ce contexte où des combinaisons entre des agents anti-BRAF et des agents anti-MEK sont d'ores et déjà testées, il serait également intéressant d'étendre notre étude aux inhibiteurs de MEK et aux traitements combinés. Des essais cliniques de première importance sont également menés dans le domaine de l'immunothérapie avec la découverte de l'ipilimumab. L'immunothérapie est un domaine d'étude beaucoup plus difficilement applicable à nos modèles d'étude *in vitro* rendant l'évaluation de ce type de thérapie difficile en dehors d'un contexte clinique.

Il a été montré à plusieurs reprises que l'expression d'ABCB5 peut être corrélée positivement à l'avancement du stade des mélanomes (Schatton et al. 2008; Sharma et al. 2010). Cependant, le développement de la maladie entraîne également une modification du régime de traitement et les stades les plus avancés pour lesquels une forte expression d'ABCB5 a été détectée correspondent donc également aux stades où les traitements par chimiothérapies sont utilisés. Il serait donc très informatif de pouvoir ré-analyser ces données en fonction de l'historique de traitement et non du stade d'avancement de la maladie.

Si dans le mélanome encore peu d'éléments sont disponibles pour statuer sur l'implication clinique d'ABCB5, l'intérêt clinique de cette protéine semble se dessiner dans les cancers colo-rectaux. Ainsi, des approches similaires ont été utilisées dans le cas des cancers colo-rectaux et montrent une implication clinique d'ABCB5 comme marqueur et acteur de la résistance au 5-Fluoro-uracile (Wilson et al. 2011).

3.2 La protéine ABCB5 peut-elle être utilisée comme marqueur de la résistance du mélanome ?

Au cours de cette étude, nous avons donc montré *in vivo* et *in vitro* que les cellules exprimant ABCB5 étaient augmentées parfois de façon considérable après traitement atteignant dans certains cas plus de 70% de la population totale. Cette propriété particulière des cellules exprimant ABCB5 pourrait permettre d'utiliser cette protéine comme marqueur de la chimiorésistance acquise du mélanome.

Dans des modèles *in vivo* et *in vitro*, il pourrait ainsi être utilisé pour quantifier la composante chimiorésistante du mélanome au cours du développement de nouveaux agents anti-mélanomes. La possibilité d'utiliser ce marqueur pour suivre la résistance dans des tests de criblage de molécules candidates au cours d'études pré-cliniques est ainsi envisageable.

Dans l'hypothèse où son implication clinique serait confirmée, il pourrait également être envisagé d'utiliser ABCB5 comme marqueur clinique de la réponse à la chimiothérapie des patients et de prédire leur évolution. De plus une étude menée par M. Thomas au cours d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Brousset a permis de montrer qu'une expression plus importante d'ABCB5 est détectée dans les patients de courte survie par rapport aux patients de longue survie faisant d'ABCB5 un marqueur pronostique potentiel. Cela a également été confirmé récemment dans la littérature (Sharma et al. 2010). Cela pourrait conduire à proposer aux patients un traitement personnalisé basé sur l'étude de marqueurs de résistance tel qu'ABCB5. Ce type d'approche est d'ores et déjà appliqué dans certains services hospitaliers dans le cas d'ABCB1 et des leucémies aiguës myéloïdes.

LA PROTEINE ABCB5 ET LES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 SONT-ELLES DES CIBLES PHARMACOLOGIQUES ?

A l'issue de ces travaux de thèse, nous nous sommes demandés si l'ensemble des données accumulées, de façon combinée à la littérature, pouvait conduire à envisager ABCB5 comme une cible pharmacologique dans une stratégie anti-mélanome.

Dans un premier temps, il faut rappeler que l'approche thérapeutique visant les transporteurs ABC permet de cibler une résistance à la fois agent-spécifique de par la spécificité de substrat mais aussi cancer spécifique en fonction du profil d'expression des transporteurs. La principale faiblesse identifiée de ces approches est, comme nous l'avons vu au cours de l'introduction bibliographique, l'importance des effets secondaires engendrés par ce type de traitement. En effet, la plupart des transporteurs ABC ciblés pour des essais cliniques sont présents dans de nombreux tissus et organes vitaux et ont un rôle physiologique important. ABCB5 quant à lui ne possède pas une distribution ubiquitaire mais au contraire est exprimé de façon beaucoup plus restreinte dans les tissus sains (mélanocytes, rétine, glandes mammaires, estomac et testicules) (Frank et al. 2005). De plus, l'expression d'ABCB5 a été retrouvée dans de nombreux types de cancers depuis sa découverte dans le mélanome. Ainsi ABCB5 est exprimé dans des cancers du sein (Yang et al. 2010), dans des cancers du foie (Cheung et al. 2011), dans des cancers colo-rectaux (Wilson et al. 2011) et dans des leucémies (de Grouw et al. 2006; Lehne et al. 2009). Cette caractéristique pourrait permettre de développer des agents anti-ABCB5 ciblant plusieurs types de cancers pour lesquels une sur-expression d'ABCB5 a été visualisée sans pour autant compromettre un trop grand nombre de tissus sains pour limiter les effets secondaires.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons vu que les cellules exprimant ABCB5 survivent *in vitro* et *in vivo* à des thérapies anti-mélanomes classique (dacarbazine et temozolomide) ou ciblées (vemurafenib). Cette constatation nous a conduit à plusieurs hypothèses : 1) la protéine ABCB5 confère aux cellules qui l'expriment un avantage de survie ; 2) les cellules exprimant ABCB5 possèdent peut-être d'autres caractéristiques intrinsèques non fonctionnellement reliées à ABCB5 qui leur confèrent un avantage de survie et 3) ABCB5

est induit en réponse au stress pharmacologique. Ces différentes hypothèses permettent d'envisager des stratégies thérapeutiques distinctes mais tout aussi intéressantes.

Enfin, une preuve de concept a déjà été développée dans la littérature avec un traitement par un anticorps anti-ABCB5 induisant une inhibition de la prise et de la croissance tumorale *in vivo* (Schatton et al. 2008).

1 PEUT-ON ENVISAGER DE CIBLER LE TRANSPORTEUR ABCB5 ?

Au cours de notre étude, nous avons essayé d'apporter des arguments en faveur de l'association du transporteur ABCB5 avec la chimiorésistance du mélanome métastatique. De plus, dans les modèles que nous avons utilisés, les transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2, connus pour leur importance dans les phénomènes de résistance des cancers, ne semblent pas jouer un rôle dans la survie des cellules exprimant ABCB5 aux agents anti-mélanome. Une étude de corrélation entre l'expression de l'ensemble des transporteurs ABC et un panel de 60 lignées cancéreuses du NCI avait montré qu'ABCB5 était sur-exprimé dans les mélanomes par rapport aux autres type tumoraux. Au même titre qu'ABCB5, trois autres transporteurs à savoir ABCC2, ABCA9 et ABCD1 en étaient également ressortis (Szakacs et al. 2004). Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de ces trois transporteurs avant et après traitement.

Lorsque des agents ciblant ABCB1 ont été développés, la littérature était très documentée sur son rôle fonctionnel physiologique et pathologique dans les cancers. L'expression de ces transporteurs avait été étudiée à l'échelle de l'organisme grâce à des souris knock-out permettant d'établir que la perte de ces transporteurs conduisait à des animaux viables et fertiles, avec toutefois une hypersensibilité à certains composés. Ces différentes études avaient donné l'espoir que les transporteurs ABC puissent constituer des cibles pharmacologiques intéressantes dans le domaine de la cancérologie avec toutes les limitations que nous leur connaissons aujourd'hui. Concernant ABCB5, l'état de l'art est bien moins avancé et ni son rôle physiologique ni son rôle pathologique ne sont clairement identifiés. De plus, aucune donnée directe ne démontre clairement sa fonctionnalité en tant que pompe d'efflux. Aucune souris transgénique knock-out pour ABCB5 n'a par ailleurs été réalisée. Des données *in vitro* et *in vivo* restent donc à établir avant de pouvoir envisager ABCB5 comme cible pharmacologique dans le cadre du mélanome.

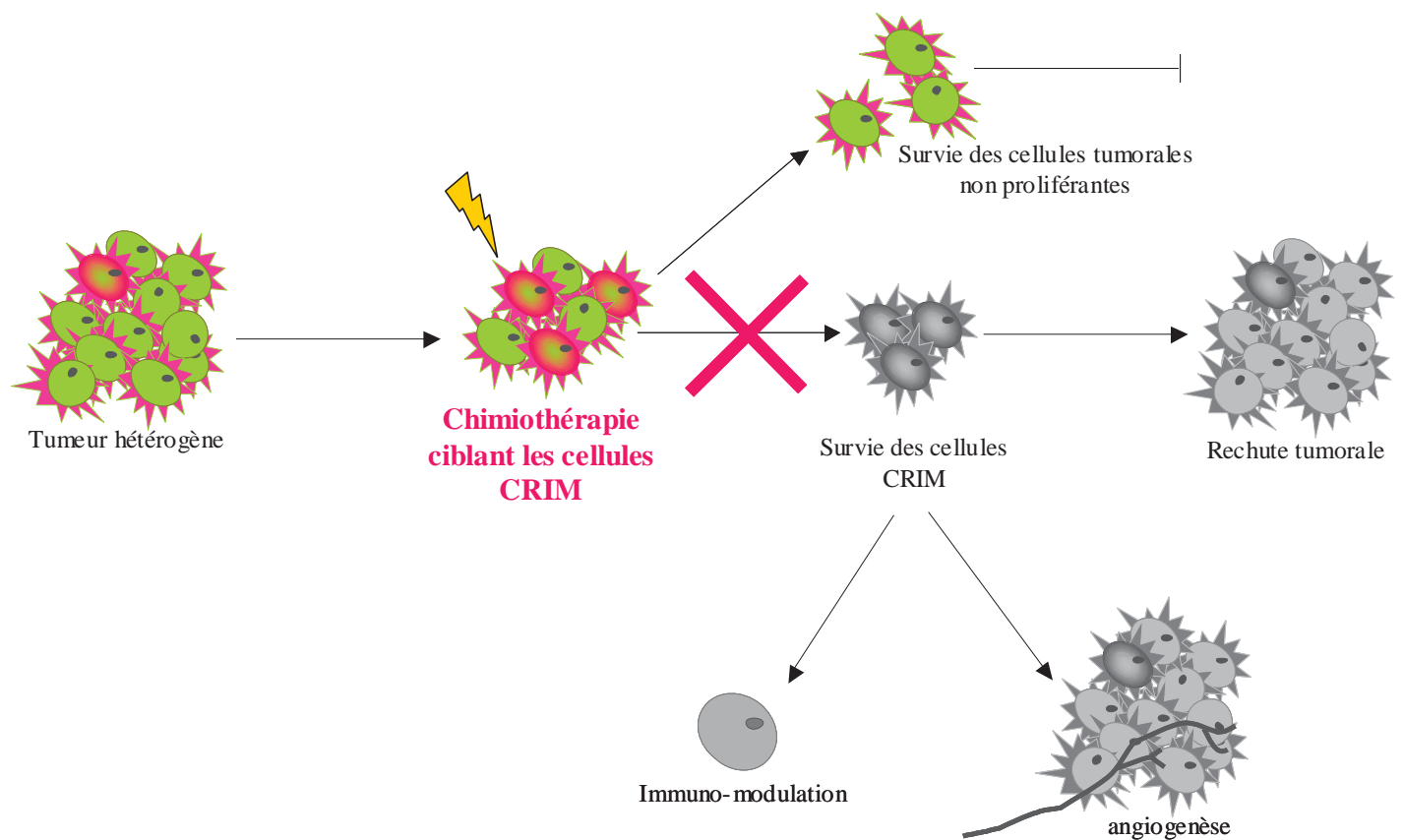


Figure 60 : Modèle des CRIM comme cible pharmacologique

Le modèle des cellules CRIM postule que ces cellules sont à l'origine de la croissance et du maintien de la tumeur ainsi que la résistance. Des études ont également mis en évidence des rôles de ces cellules au niveau de la répression de la réponse immunitaire ainsi que dans l'angiogenèse. En ciblant ces cellules, il est donc envisagé de pouvoir contrer l'ensemble de ces fonctions et conduire à une régression tumorale.

2 PEUT-ON ENVISAGER DE CIBLER LES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 ?

Même dans le cas où le transporteur ABCB5 ne serait pas impliqué directement et fonctionnellement dans la résistance, il n'en reste pas moins que cette protéine a été identifiée dans ces travaux de thèse comme marqueur de la population résiduelle après traitement. De plus, dans la littérature, les cellules exprimant ABCB5 sont identifiées comme cellules CRIM et un traitement par un anticorps anti-ABCB5 permet *in vivo* d'induire une inhibition de la croissance tumorale (Schatton et al. 2008). Ces deux caractéristiques pourraient faire de ces cellules des cibles pharmacologiques potentielles. En effet, en considérant que cette population pourrait être responsable du développement, du maintien et de la chimiorésistance de la tumeur, leur éradication pourrait entraîner une régression de l'ensemble de la population tumorale.

En se basant sur le concept des cellules CRIM, éradiquer ces cellules permettrait à la fois d'inhiber la croissance tumorale, d'éviter son développement, de contourner la chimiorésistance et de prévenir la rechute métastatique (figure 60). Les thérapies actuelles ciblent de façon préférentielle les cellules rapidement proliférantes et de nombreuses études viennent aujourd'hui confirmer l'idée que ces sous-populations sont résistantes à ce type de traitement (pour revue Smalley and Herlyn 2009). Dans le cas de la sous-population exprimant ABCB5, notre étude et d'autres argumentent en faveur d'une résistance particulière de ces cellules à la chimiothérapie classique (Chartrain, M. et al. soumis ; Wilson et al. 2011). Même si les propriétés CRIM des cellules exprimant ABCB5 restent à confirmer, la possibilité de cibler de telles cellules en parallèle ou en remplacement des thérapies actuelles apparaît séduisante.

Parmi les cellules survivantes aux traitements, toutes n'expriment pas ABCB5, prouvant que si ABCB5 participe au phénomène de résistance, il ne s'agit pas du seul mécanisme à y participer. Cibler la population ne permettrait donc pas de résoudre la totalité de la chimiorésistance. En effet en suivant le concept des cellules CRIM, la présence, même en très faible quantité, de ce type de cellules pourrait conduire à reformer une tumeur hétérogène. Il faudrait donc envisager de cibler l'ensemble de la sous-population CRIM, en caractérisant un marqueur unique et exhaustif de l'ensemble de cette sous-population. Or aucune donnée ne permet actuellement de prédire l'existence même de ce marqueur unique.

3 COMMENT EXPLOITER ABCB5 ET LES CELLULES EXPRIMANT ABCB5 EN TANT QUE CIBLE PHARMACOLOGIQUE POUR UNE STRATEGIE ANTI-MELANOME ?

Des stratégies thérapeutiques consistant à cibler des cellules souches cancéreuses ont déjà été entreprises dans le cas des cellules souches leucémiques. L'approche la plus développée dans ce contexte a été de cibler la niche de ces cellules souches cancéreuses notamment dans le cas des cellules souches de leucémies avec le développement d'asparaginase ou d'inhibiteurs de CD44 qui, normalement, permet aux cellules souches leucémiques d'interagir avec leur micro-environnement (pour revue, Smalley and Herlyn 2009). Dans le cas du mélanome et des cellules CRIM, des stratégies visant le micro-environnement ont été élaborées en ciblant des protéines telles que MCAM ou l'intégrine $\beta 3$. Une autre possibilité serait de cibler spécifiquement les voies de signalisation impliquées dans les processus d'auto-renouvellement et de maintien du caractère indifférencié propres aux cellules CRIM. Cependant, un gros travail reste encore à faire pour identifier et valider l'approche thérapeutique de ce genre de stratégies. Les différents marqueurs permettant d'identifier les cellules CRIM pourraient également être utilisés pour cibler cette population. Appliqué aux cellules exprimant ABCB5, ce concept pourrait être envisagé sous la forme d'une petite molécule vectorisée par un anticorps anti-ABCB5 ou de façon simultanée un ensemble de plusieurs sous-populations identifiées par différents marqueurs pour tenter d'éliminer l'ensemble des sous-populations CRIM.

La stratégie thérapeutique consistant à cibler le transporteur ABCB5 permettrait dans la mesure où le rôle fonctionnel d'ABCB5 est validé de contourner un des mécanismes de résistance des cellules de mélanome. Le risque de cette approche serait d'endommager également les tissus sains exprimant ABCB5 (mélanocytes, rétine, glandes mammaires, estomac et testicules). Ce type d'approche thérapeutique serait envisagé en combinaison avec des chimiothérapies dès lors que les substrats de ce transporteur auront été identifiés. Différentes approches pourraient alors être envisagées. La première d'entre elles pourrait passer par le développement de petites molécules inhibant le rôle fonctionnel de la pompe d'efflux d'ABCB5 en entrant en compétition avec la fixation du substrat ou de l'ATP par exemple. Une autre stratégie pourrait être une approche anticorps où un anticorps anti-ABCB5 viendrait bloquer l'action de la pompe. Le développement d'un tel anticorps a déjà été proposé et permet à la fois une inhibition de la prise et de la croissance tumorale (Schatton et

al. 2008). Différentes approches thérapeutiques sont également développées pour d'autres transporteurs tels que ABCB1 et ABCC1 et pourraient être applicables à la problématique d'ABCB5. Ainsi, des stratégies d'inhibition au niveau ARN messager commencent à apparaître avec des oligonucléotides antisens, des ribozomes, des siRNA et des shRNA. Cependant des difficultés techniques et éthiques n'ont pas encore permis de tester de telles approches au niveau clinique. Un aspect moins connu du phénotype MDR est l'apparition d'une hypersensibilité face à des agents cytotoxiques appartenant à une classe thérapeutique différente du composé anti-cancéreux étant à l'origine de la résistance. Ce gain de sensibilité des lignées résistantes est appelé sensibilité collatérale (Hall et al. 2009). Si le concept de la sensibilité collatérale a été relativement bien développé et démontré dans le cas d'ABCB1, ce n'est pas le cas pour le transporteur ABCB5, il serait intéressant d'explorer ce phénomène pour ABCB5. Dans cette optique, l'utilisation de lignées résistantes à long terme à la dacarbazine, ou au vemurafenib permettrait de détecter l'existence d'une sensibilité collatérale pour ABCB5 et il serait alors envisageable d'en tirer parti pour développer des agents anti-mélanomes innovants comme cela a déjà été pressenti pour ABCB1.

CONCLUSION

GENERALE

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence une propriété particulière des cellules exprimant ABCB5 face aux traitements anti-mélanomes. En effet, dans des modèles *in vitro*, *in vivo*, sur des échantillons de patients *ex vivo* et de façon préliminaire sur une petite cohorte de patients, les cellules exprimant ABCB5 sont augmentées suite à des traitements à la dacarbazine, au vemurafenib et à un panel plus large d'agents anti-cancéreux. Même si cela reste à confirmer, ces résultats ne sont pas en faveur d'un rôle fonctionnel de l'isoforme 2 d'ABCB5 dans la chimiorésistance et dans le phénotype CRIM. Cependant, ils étayent la théorie d'une plasticité très grande des cellules de mélanome face à leur environnement dont ABCB5 pourrait être le marqueur. Une validation clinique approfondie de ce concept pourrait permettre d'envisager l'utilisation d'ABCB5 comme cible pour améliorer les thérapies déjà existantes ou pour développer de nouvelles molécules anti-mélanome innovantes.

MATERIEL ET METHODES

1 BIOLOGIE CELLULAIRE

1.1 La culture cellulaire

1.1.1 Lignées cellulaires et conditions de culture

Plusieurs lignées cellulaires établies de mélanome et non mélanome ont été utilisées dans cette étude.

Parmi les lignées de mélanome étudiées, on retrouve les lignées WM-115, WM-266-4 et G-361 issues de l'European Collection of Cell Culture (ECACC) ainsi que les lignées SK-MEL-28, SK-MEL-2, SK-MEL-5 et A-375 fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC).

Les lignées WM-115 et WM-266-4 proviennent respectivement d'une tumeur primaire et métastatique d'une même patiente de 58 ans. La lignée G-361 est issue d'un mélanome métastatique d'un homme de 31 ans. La lignée SK-MEL-28 provient d'un mélanome métastatique d'un homme de 51 ans. La lignée SK-MEL-2 est issue d'une métastase cutanée de la cuisse d'un homme de 60 ans. La lignée SK-MEL-5 provient d'une métastase des ganglions axillaires d'une femme de 24 ans. Enfin, la lignée A-375 provient d'un mélanome métastatique d'une femme de 54 ans.

Le panel non mélanome comprend la lignée A-549 (adénocarcinome pulmonaire), la lignée BxCP3 (cancer du pancréas), la lignée HCT116 (carcinome du colon), la lignée Lovo (adénocarcinome du colon), la lignée Hela (cancer du col de l'utérus), la lignée SKOV3 (adénocarcinome des ovaires) provenant de l'ATCC. Les lignées KB et KB-V1 toutes deux dérivées de la lignée Hela et ayant, pour la lignée KB-V1, été sélectionnée pour sa résistance à la vinblastine (Shen et al, 1986 ; Cornwell et al, 1987) proviennent de la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

Les lignées WM-266-4, WM-115, G-361, A-375 et KB ont été cultivées en milieu DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium) ((+) 4,5g/L glucose, (+) L-glutamine, (-) Pyruvate) (Gibco®, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (Sigma). La lignée SK-MEL-28 a été cultivée en milieu MEM (Minimum Essential Medium) ((+) 4,5g/L glucose, (+) L-glutamine, (-) Pyruvate) (Gibco®, Invitrogen) supplémenté avec 10 % de SVF décomplémenté, 2mM de glutamine (Gibco®,

Nom du produit	EC50 WM-266-4	EC50 WM-115	EC50 A-375	EC50 G-361	EC50 SK-MEL-28	Fournisseur
Camptothecine	$2 \cdot 10^{-8} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-7} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-8} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-8} \text{M}$	-	Acros, Thermo-Fisher, Illkirch, France
Dacarbazine	10^{-5}M	$>10^{-5} \text{M}$	$3 \cdot 10^{-6} \text{M}$	$6 \cdot 10^{-7} \text{M}$	10^{-5}M	Sigma
Doxorubicine	$5 \cdot 10^{-8} \text{M}$	$8 \cdot 10^{-8} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-8} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-7} \text{M}$	-	Sigma
Etoposide	10^{-6}M	$>10^{-5} \text{M}$	$3 \cdot 10^{-7} \text{M}$	$>10^{-5} \text{M}$	$3 \cdot 10^{-6} \text{M}$	Sicor, Irvin, CA, USA
Gemcitabine	$2 \cdot 10^{-8} \text{M}$	$9 \cdot 10^{-8} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-9} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-8} \text{M}$	-	Lilly
Sorafenib	$>10^{-5} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-6} \text{M}$	$>10^{-5} \text{M}$	$>10^{-5} \text{M}$	-	Biosciences
Taxol	$3 \cdot 10^{-8} \text{M}$	10^{-8}M	$4 \cdot 10^{-10} \text{M}$	$5 \cdot 10^{-9} \text{M}$	$>10^{-5} \text{M}$	Sigma
Vemurafenib	$4 \cdot 10^{-7} \text{M}$	-	$2 \cdot 10^{-7} \text{M}$	-	-	Euromedex, Selleckchem
Vinblastine	$3 \cdot 10^{-8} \text{M}$	-	-	-	-	Sigma
Vincristine	$3 \cdot 10^{-9} \text{M}$	-	-	-	-	Sigma
Vindésine	$3 \cdot 10^{-9} \text{M}$	-	-	-	-	Lilly, Suresnes, France
Vinorelbine	$6 \cdot 10^{-8} \text{M}$	$3 \cdot 10^{-11} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-10} \text{M}$	$5 \cdot 10^{-10} \text{M}$	$1 \cdot 10^{-8} \text{M}$	Pierre Fabre, service de re-synthèse

Tableau 15 : IC₅₀ des lignées de mélanomes en réponse à différents agents anti-cancéreux

Les IC₅₀ des différents agents anti-cancéreux sont indiquées lorsqu'elles sont connues pour les lignées de mélanomes WM-266-4, WM-115, A-375, G-361 et SK-MEL-28. Les fournisseurs des composés sont également donnés.

Invitrogen), 1mM de Pyruvate de sodium (Gibco®, Invitrogen) et 0,1mM d'acides aminés non essentiels (Gibco®, Invitrogen). La lignée KB-V1 a été cultivée en milieu MEM supplémentée avec 15 % de SVF, 2mM de glutamine, 1mM de Pyruvate de sodium et 0,1mM d'acides aminés non essentiels. L'ensemble des milieux ont été supplémentés par 100U/mL de Pénicilline/Streptomycine (Gibco®, Invitrogen) et 1,25 µg/mL de fungizone (Gibco®, Invitrogen). Toutes les cellules ont été incubées à 37°C sous atmosphère humide (97% RH) et contenant 5% de CO₂.

1.1.2 Culture des mélanosphères

Les lignées de mélanomes WM-266-4, WM-115 et G-361 ont été cultivées en mélanosphères. Pour former des mélanosphères, les cellules sontensemencées à 90 10³ cellules/cm² dans leur milieu de culture classique jusqu'à leur adhésion (6h). Après leur adhésion, le milieu est remplacé par le milieu Melanocyte Growth Medium M2 supplémenté avec le Supplement Mix (provenant tous deux de PromoCell Biosciences Alive, Heidelberg, Allemagne). Le milieu est changé régulièrement tous les deux à trois jours pour le maintien en culture.

Les sphéroïdes ont été obtenus au sein de l'équipe par culture liquide sur couche d'agarose selon la méthode de Lund-Johansen.

1.1.3 Traitements cytotoxiques

Les produits sont initialement sous forme de poudre, ils sont repris extemporanément en solution avec du DMSO (Sigma™). Les différentes dilutions des agents à tester dans le milieu de culture sont préparées de telle sorte que le pourcentage final de DMSO soit inférieur à 0,1% au contact des cellules.

Lorsque cela est mentionné, un traitement au cycloheximide (Sigma) ou à la Brefeldine A (Sigma) a été utilisé. Le traitement au cycloheximide est réalisé à 10µg/mL pendant 24h avant la fin du traitement par les agents anti-cancéreux. Le traitement à la Brefeldine A est réalisé à 10µg/mL pendant 4h avant la fin du traitement par les agents anti-cancéreux.

1.1.4 Suivi de la division cellulaire

La division cellulaire a été suivie par marquage au CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester, Invitrogen). Le CFSE est un colorant qui, une fois entré dans la cellule,

devient fluorescent et se distribue de façon égale entre les cellules filles au cours des divisions cellulaires. Les cellules sont récoltées, puis lavées avant d'être marquées au CFSE à une concentration de 1 μ M dans du PBS. Le marquage est stoppé immédiatement par l'ajout d'un volume égal de sérum de veau fœtal. Les cellules sont ensuite lavées au PBS et re-ensemencées. 24h après le marquage, le milieu de culture est changé pour enlever l'excédent de CFSE. Le profil de dilution du CFSE peut ensuite être analysé par cytométrie en flux.

1.2 Cytotoxicité par la technique d'ATP-lite

Les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits à une densité de 1.10⁴ cellules/mL pour la lignée A375, de 2.10⁴ cellules/mL pour les lignées G361, WM115 et WM266-4 et de 2,5.10⁴ cellules/mL pour la lignée Sk-Mel-28. Elles sont ensuite incubées à 37°C sous une atmosphère enrichie en CO₂ (5%). 24h après ensemencement, les cellules sont incubées en présence de huit concentrations différentes (gamme log ou semi-log) de chaque produit à tester en 3 à 6 réplicats puis incubées pendant 72 heures à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂ (5%). La viabilité cellulaire est ensuite déterminée conformément au protocole fourni dans le kit ATP Lite- M (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). 50 μ l de tampon de lyse puis 50 μ l de solution luciférase/luciférine sont ainsi ajoutés sur les plaques. La luminescence, proportionnelle à la concentration d'ATP dans les cellules, est ensuite mesurée à l'aide du Top Count NXT Microplate Scintillation and Luminescence Counter (Perkin Elmer) à 20 °C. Les valeurs ainsi obtenues sont corrigées par la valeur moyenne du traitement par le DMSO seul et moyennées par colonne (moyenne de 3 à 6 réplicats). Les données sont alors traitées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software), afin d'obtenir une courbe de cytotoxicité (pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la concentration de produit cytotoxique) et de calculer l'IC₅₀ de chaque produit.

La liste des produits utilisés ainsi que l'IC₅₀ des lignées de mélanomes pour chacun de ces produits et le fournisseur sont données dans le tableau 15.

1.3 Transfection stable du vecteur de sur-expression d'ABCB5

Les cellules ont été ensemencées 24h avant transfection dans des boîtes de diamètre 6cm à raison de 6 10⁵ cellules par boîte. La transfection est ensuite réalisée avec 4 μ g d'ADN (p3Xflag/ABCB5) en utilisant l'agent de transfection Fugene à un ratio 3 : 2 dans un volume final de 200 μ L ajouté aux 4mL de milieu de culture. Après 48h les cellules sont décollées à la

trypsin et réparties dans des boîtes de diamètres 10cm (dilution au 1/20^{ème}) afin d'obtenir des clones individualisés et facilement repérables. Au bout de 24h l'agent de sélection généticine (Invitrogène) est ajouté à une concentration de 0,8mg/mL pour sélectionner les cellules ayant intégré le vecteur dans leur génome. Une quinzaine de jours après le début de la sélection, les clones sont isolés et récupérés à l'aide de cylindres de clonages stériles, et déposés dans une plaque-24-puits. Les cellules issues des clones sélectionnés ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (Sigma), 100U.mL⁻¹ de Pénicilline/Streptomycine (Gibco®, Invitrogen) et 1,25 µg.mL⁻¹ de fungizone (Gibco®, Invitrogen) à 37°C, 5% CO₂ et maintenues sous pression de sélection à 1mg/mL de généticine.

1.4 Transfection siRNA et vecteur d'expression ABCB5

Les siRNA ciblant ABCB5 ont été commandés chez Applied Biosystem (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). La séquence cible du si RNA utilisé dans cette étude est la suivante : 5'-ggucggacuacaauuggg-3'.

Le siRNA contrôle est un siRNA ciblant la luciférase provenant également d'Applied Biosystem. Les expériences d'extinction de l'expression d'ABCB5 par siRNA ont été réalisées avec l'agent de transfection lipofectamine 2000 (Invitrogen) conformément au protocole du fournisseur après 24h de déprivation de sérum. Les analyses d'extinctions sont ensuite réalisées 72h après transfection.

1.5 Description des anticorps

Différents anticorps anti-ABCB5 ont été utilisés dans cette étude. Pour les études par cytométrie en flux, les anticorps ABCB5 Ac^{Rockland} (Rockland, Gilbertsvill, PA, USA), et Ac^{AbD Serotech} (clone 3C2-1D12, AbD Serotech, Oxford, UK) ont été utilisés. L'anticorps Ac^{Rockland} est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un épitope dont la séquence n'a pas été communiquée. Il a été utilisé combiné à un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (GAR-Alexa Fluor 488, Invitrogen). L'anticorps Ac^{AbD Serotec} est un anticorps monoclonal de souris spécifique de la séquence immunogène : RFGAYLIQAGRMTPEG qui a été révélé par un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplés à l'Alexa Fluor 647 (GAM-Alexa Fluor 647, Invitrogen). Les études par Western Blot et immunofluorescence ont été réalisées avec l'anticorps Ac^{Rockland} combiné respectivement à un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase et à l'anticorps secondaire utilisé pour la cytométrie en flux. Les études d'immunohistochimie ont été faites

avec l'anticorps Ac^{Sigma} (Sigma), un anticorps polyclonal de lapin dont la séquence immunogène est : DLIVTLKDGMLAEKGAHAELMAKRGLYYSLVMSQDIKKADE QMESMTYSTERKTNSLPLHSVKSISDFIDKAEESTQSKEISLPEVSSL.

L'anticorps anti-ABCB1 utilisé en cytométrie en flux est un anticorps monoclonal de souris (clone MM4.17, Millipore, Molsheim, France). L'anticorps anti-HMB45 est un anticorps monoclonal de souris (Dako). Ces deux anticorps ont été utilisés de façon combinée à un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG souris couplé à l'Alexa-647 (GAM-Alexa Fluor 647, Invitrogen).

1.6 Cytométrie en flux

L'expression des marqueurs à la surface des lignées de mélanome a été étudiée par cytométrie en flux (cytomètre LSRII ou ARIA avec logiciel FACS Diva, BD Biosciences, Le Pont-De-Claix, France). Les cellules ont été décollées de la surface de culture par traitement PBS/EDTA 2mM et dissociation mécanique. Elles ont ensuite été lavées, reprises en PBS/BSA1% et comptées au Vi-Cell-XR (Cell Viability Analyzer de chez Beckman Coulter). Les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires ou un isotype contrôle utilisés à une concentration équivalente pendant 45 minutes à 4°C (6µg/mL d'anticorps Ac^{Rockland}, 10µg/mL d'anticorps AC^{AbD Serotec} ou 5 µg/mL d'anticorps anti-ABCB1). Les cellules ont par la suite été lavées en PBS/BSA 1% puis incubées 30min à 4°C en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (comme décrit précédemment dans la section anticorps). Enfin, les cellules ont été lavées et reprises dans une solution de DAPI 0,5µg/mL (Sigma) avant d'être analysées par cytométrie en flux. Le marquage ABCB5 ou ABCB1 a été analysé à partir de la population vivante visualisée par un marquage négatif au DAPI.

1.7 Tri cellulaire

Des études de tri cellulaire ont été réalisées après marquage ABCB5 avec l'anticorps Ac^{Rockland} comme décrit dans la section cytométrie en flux (cytomètre ARIA, avec logiciel FACS DIVA, BD Biosciences). Les cellules sont marquées à une densité de 20 millions de cellules par mL puis diluées après lavage du DAPI à 7 000 cellules/mL. Une buse de 100µm est utilisée lors du tri et la vitesse de la fluidique est réglée aux alentours de 20 000 événements/seconde. Les cellules sont collectées dans des tubes contenant 500µL de sérum de veau fœtal. Les cellules sont ensuite centrifugées et comptées puis ré-ensemencées sur un support pré-traité avec 0,1% de gélatine dans un milieu conditionné.

1.8 Western Blot

Les cellules sont lysées à l'aide d'un Dounce homogenizer dans une solution contenant 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM EGTA, 5mM NaF, 1mM NaVO₄, 0.1% NP40 et 0.1% Triton X114 complémenté ex-temporairement avec 1mM DTT et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Calbiochem, Merk Chemical, Nottingham, UK) à une concentration de 10⁷ cellules/mL. Les cellules non lysées et les noyaux sont éliminés par centrifugation à 600g pendant 1 minute et les culots sont lavés avec 100µL de solution de lyse. Le surnageant est ensuite ultra-centrifugé 30 minutes à 72 000g. Les culots membranaires sont solubilisés dans 2% SDS, 15% glycerol, 50mM dithiothreitol dans 10mM Tris pH8 et chauffés à 37°C pendant 1 heure puis soniqués. Les échantillons sont séparés par migration sur gel SDS-PAGE 8% d'acrylamide et transférés sur des membranes de PolyVinylidene DiFluoruride (PVDF) à 4° et 20 Volt sur la nuit. Après une saturation dans 5% lait dans du TBS-0,1% Tween, la membrane est incubée avec l'anticorps Ac^{Rockland} (1/2000 dilué dans du TBS-0,1% Tween 1% BSA) ou avec un anticorps anti-actine clone C4, Millipore, 1/1000 dans TBS-0,1% Tween 5% lait). Après lavages au TBS-0,1% Tween, les membranes sont révélées par un anticorps secondaire chèvre anti-IgG lapin ou chèvre anti-IgG souris couplé peroxydase (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) et le signal est détecté par ECL (GE Healthcare).

1.9 Immunofluorescence

Les cellules sontensemencées sur lamelles de verre pendant 24h avant d'être traitées à la substance indiquée. Après 72h de traitement, les cellules sont légèrement fixées pendant 5 minutes dans 1% paraformaldehyde. Le marquage ABCB5 par l'anticorps Ac^{Rockland} est réalisé comme décrit dans la section cytométrie en flux. Les cellules sont ensuite fixées 15 minutes dans 4% paraformaldehyde et montées entre lame et lamelle. Les images en contraste de phase (DIC pour Differential Interference Contrast) et fluorescence ont été acquises sur un microscope Visiolog6.4 (Noesis) et automated Axio Imager Z1 epifluorescent microscope (Zeiss) avec une caméra Hamamatsu black and white Orca-285 et un objectif 63x (immersion à huile, na=1.4).

1.10 Immunohistochimie

Les tumeurs issues des xénogreffes ont été fixées pendant 24h dans une solution de formalin 4% à 4°C avant d'être déshydratées dans du toluène pendant 3min suivi de 3min d'incubation dans de l'isopropanol-2 et de 3min d'incubation dans de l'éthanol à 95%. Les

échantillons tumoraux ont ensuite été intégrés à une matrice de paraffine et coupés en sections de 4µm. Après une étape de déparaffinisation et de réhydratation, l'activité endogène des peroxydase a été inhibée par une incubation de 15min dans 3% de peroxyde d'hydrogène. Un module de marquage (Dako, Glostrup, Denmark) a été utilisé pour le marquage histologique. Les lames ont été incubées avec les anticorps primaires anti-caspase 3 activée (Cell Signaling, Denver, MA, USA) dilué au 400ème, ou anti-ABCB5 Ac^{Sigma} dilué au 1/100ème puis avec les anticorps secondaires anti-lapin couplé peroxydase et révélées par une méthode colorimétrique (Envision kit, Dako, Glostrup, Denmark). L'ensemble des sections d'immunomarquages colorimétriques ont été contre-marquées à l'hématoxylin. Les sections marquées ont été analysées avec un microscope Nikon (Eclipse E800).

2 ETUDES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.1 Extraction des ARNs

Les cellules ont été centrifugées puis lavées au PBS. Les ARNs totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) conformément au protocole du fournisseur. Le dosage des ARNs totaux a été effectué au NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific).

2.2 Synthèse des cDNAs et PCR quantitative en temps réel

La synthèse d'ADNc a été réalisée grâce au kit iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad) à partir d'1µg d'ARN total. Le produit de rétro-transcription ADNc (0,5µL) est amplifié par des couples d'amorces spécifiques des gènes d'intérêt (ABCB5, ABCB1, ABCC1 ou ABCG2) ou de gènes de ménage (HMBS pour HydroxyMethylBilane Synthase et RPLP0 pour Ribosomal Protein, Large, P0). Les séquences des amorces spécifiques des différentes isoformes d'ABCB5 ont été conçues à l'aide du logiciel Primer 3 Plus. Les séquences des amorces utilisées sont :

ABCB5 isoform 1 et 2 (couple1) : 5'-ccaaatcgggggctgcgcattctgtt-3' (sens) et 5'-agccgctgctccc cacaatgcta-3' (anti-sens) ; **ABCB5 isoforme 1 (couple 2)** : 5'-ttataactgcagcacgaca gaccaa-3' (sens) et 5'-atgcgagtgttaagttcaccgatgt-3' (anti-sens) ; **ABCB5 isoforme 2 à 4 (couple3)** : 5'-ggccttttgctaagatcaagtgt-3' (sens) et 5'- gaaggtttcaaagtgagggactgct-3' (anti-sens) ; **ABCB1** : 5'- tgacatttattcaaagttaaaagca-3' (sens) et 5'- tagacactttatgcaaacatttcaa-3' (anti-sens) ; **ABCC1** : 5'- agtgggaacctctctgtttaag-3' (sens) et 5'- aacagcagcagcgtgtagaa-3' (anti-sens) ; **ABCG2** : 5'- ccgcgacagtttccaatgacct-3' (sens) et 5'- gccgaagagctgctgagaactgt-3' (anti-sens) ; **HMBS** : 5'-atacagacggacagtgtggtgg-3' (sens) et 5'-ccctgtggtggacatagcaatga-3' (anti-sens) ; **RPLP0** : 5'-ggcgacctggaagtccaact-3' (sens) et 5'-ccatcagcaccacagccttc-3' (anti-sens).

La PCR quantitative en temps réel est effectuée sur iCycler (Biorad) en utilisant le kit iQ SYBR Green Supermix PCR (Biorad). Les quantités relatives des transcrits sont évaluées selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$.

2.3 Gels ADN/ARN

Les produits d'amplification des PCR quantitatives en temps réel sont déposés sur des gels 2% d'agarose (Qbiogene) et migrés à 100volt pendant 20minutes. La présence d'ADN est révélée par du bromure d'éthidium (BET) à une concentration 0,5 µg/mL et analysée par exposition aux UV (Bio-Rad).

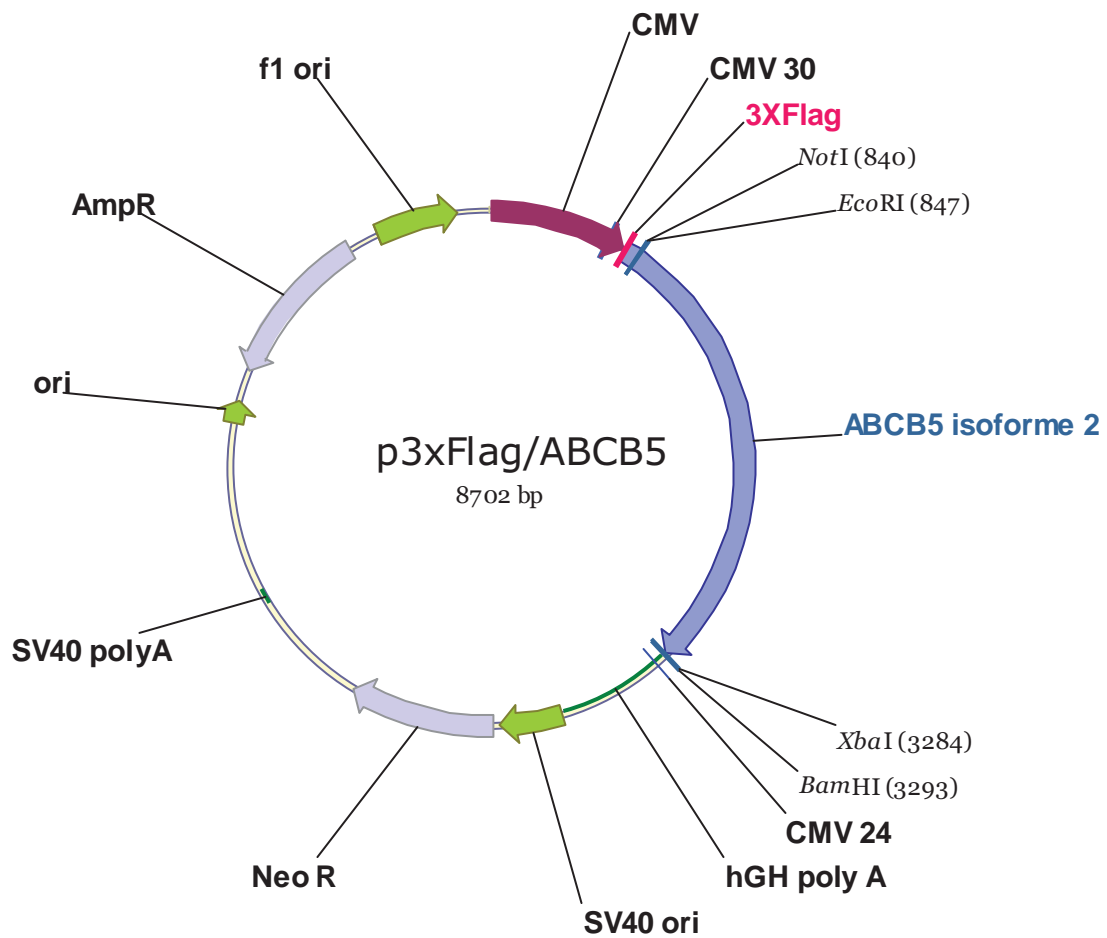


Figure 61 : Carte du vecteur p3XFlag/ABCB5

La carte du vecteur p3XFlag/ABCB5 est représentée. Les sites de restriction NotI, EcoRI, XbaI et BamHI utilisés pour le clonage sont indiqués ainsi que la position du promoteur CMV (en violet), du tag Flag (en rose), de la séquence d'ABCB5 isoforme 2 (en bleu) et du gène de résistance à la généticine (en gris indiqué NeoR).

2.4 Construction des vecteurs d'expression d'ABCB5 isoforme 2

La retro-transcription a été effectuée sur 5µg d'ARN total de cellules G-361 avec le kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Un fragment cDNA de 2439bp contenant entièrement la partie CDS d'ABCB5 isoforme 2 a été amplifié par PCR à partir du produit de rétro-transcription en utilisant les primers suivant : 5' AAGCGGCCGCGATGAA TTCGGATGAGAATGACATCAGAGC 3' (sens) et 5' AGGATCCTCATCTAGACTGCACTGAC TGTGCATTAC 3' (anti-sens) et la polymérase Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega) sur 40 cycles. Le produit a été cloné, après migration sur gel d'agarose, dans le vecteur TOPO-TA (Invitrogen), transformé et amplifié dans des bactéries compétentes TOP10 Escherichia coli (Invitrogen) puis purifié (kit QIAprep Spin Qiagen puis kit Maxi JetStar de Genomed) et séquencé par électrophorèse capillaire (kit ABI PRISM BigDye Terminators v3.1 Cycle Sequencing d'Applied Biosystems). Une étape de sous-clonage a été réalisée pour cloner au choix dans le vecteur p3Xflag CMV10 d'Invitrogen ((flag)3 en N-terminal d'ABCB5 isoforme 2) par digestion du produit TOPO-TA par Eco-RI/BamHI (Biolabs) (figure 61) ou dans le vecteur p3Xflag CMV14 d'Invitrogen ((flag)3 en C-terminal d'ABCB5 isoforme 2) par digestion du produit TOPO-TA par NotI/XbaI. Les produits de digestion ont été purifiés (migration sur gel d'agarose puis utilisation du kit CleanGene de MP Biomedicals), ligués par la T4 DNA ligase de BioLabs, redigérés par BglII (Biolabs), transformés dans TOP10 Escherichia coli (Invitrogen), puis purifiés et séquencés comme lors du clonage dans TOPO-TA.

2.5 Séquençage

Le séquençage des produits amplifiés par PCR avec les amorces ABCB5 spécifiques des différentes isoformes a été réalisé par la technique de TA-clonning. Les fragments amplifiés par la Taq polymérase ont donc été clonés dans un vecteur M13 et transformés dans des bactéries chimio-compétentes. Après croissance bactérienne, les colonies ont été repiquées. La présence et la nature des inserts dans le vecteur ont ensuite été vérifiées par PCR sur colonie. Après avoir effectué la réaction de séquence, les produits ont été séquencés. Les séquences obtenues ont ensuite été alignées sous Blast avec l'ensemble de la base de données des cDNAs.

3 ETUDE *IN VIVO*

3.1 Souris (provenance et condition d'élevage)

Les études *in vivo* ont été réalisées sur des souris femelles nude athymiques (Ico : Swiss-nu/nu, Charles River, Saint-Germain-sur-L'Arbresle, France). Les animaux ont été élevés et manipulés en respectant les normes décrites dans la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996) et les directives européennes EEC/86/609, sous la responsabilité d'expérimentateurs habilités. L'ensemble des expériences ont été menées de façon conforme aux directives des comités éthiques français et local (Direction des Services Vétérinaires, Haute-Garonne, Toulouse) basées sur les recommandations de l'UKCCCR sur le bien-être des animaux destinés à l'expérimentation anti-cancéreuse.

3.2 Greffe sous-cutanée

Les cellules WM-266-4 ont été greffées par voie sous-cutanée à raison de 5×10^6 cellules par souris. Une fois les tumeurs ayant atteint un volume médian de 100 à 200 mm³, les cages ont été randomisées pour le traitement et le temozolomide ou la solution contrôle (20%DMSO, 5% Tween 80 et 75% glucose 5%) a été injecté par voie intra-péritonéale à raison de 4 injections en 8 jours suivant le schéma [q2dx3] à une dose de 80mg/Kg. Durant les phases de traitement chimio thérapeutique, les souris ont été surveillées quotidiennement et pesées 3 fois par semaine. Les tumeurs ont été mesurées au pied à coulisse et les volumes tumoraux (mm³) ont été estimés à $0,5 \times (\text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{épaisseur})$. Les résultats sont présentés sous la forme $T/T_0 (\%) = \text{moyenne de (volume tumoral au jour X du traitement / le volume tumoral au jour 0)} \times 100$.

3.3 Dissociation des tumeurs ex-vivo et co-marquage CD44

Les tumeurs ont été collectées et dissociées à l'aide d'un cocktail enzymatique de collagénase (1000UI/mL, Sigma), élastase (30UI/mL, Sigma) et DNase (1mg/mL, Sigma) dans du milieu de culture. Après filtration sur des tamis cellulaires d'un diamètre de 70µm, les suspensions cellulaires sont comptées et utilisées pour analyses.

Dans le cas d'une analyse par cytométrie en flux, les cellules sont co-marquées avec l'anticorps d'intérêt et un anticorps anti-CD44 humain (hCD44) conjugué à l'Alexa Fluor-647 (clone C26, Beckton Dickinson Pharmingen, San Diego, CA, USA) dans l'optique de distinguer les cellules tumorales humaines (hCD44⁺) des cellules infiltrantes murines (hCD44⁻).

4 ETUDE SUR LES PRELEVEMENTS DE PATIENTS

4.1 Etude d'échantillons cliniques avant et après traitement

Un total de 15 échantillons, provenant de 8 patients atteints d'un mélanome, a été obtenu auprès de la banque de tumeur du département de Pathologie du CHU Toulouse-Purpan. Les échantillons ont été collectés entre 2006 et 2011 soit avant traitement (n=8) soit après traitement (n=7) par monochimiothérapie au déticène (dacarbazine). L'ensemble des échantillons provient de métastases cutanées ou sous-cutanées et correspond à des patients en stade IV (selon la classification AJCC). L'ensemble des échantillons a été fixé au formol ou au Bouin avant d'être inclus en bloc de paraffine et analysé par immunohistochimie comme décrit dans le paragraphe correspondant.

4.2 Etude ex vivo de prélèvements de patients

Un prélèvement de patient atteint d'un mélanome de stade IV (selon la classification AJCC) a été obtenu au département de Pathologie du CHU Toulouse-Purpan. L'échantillon est issu d'une métastase cutanée après traitement à l'interféron en juin 2010 et au déticène (dacarbazine) entre novembre 2010 et mars 2011. L'échantillon fraîchement dissocié (comme décrit dans le paragraphe concernant les dissociations de xénogreffes) a ensuite été remis en culture ex vivo dans un milieu DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium) ((+) 4,5g/L glucose, (+) L-glutamine, (-) Pyruvate) (Gibco®, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (Sigma). Les traitements et marquages ABCB5 ont été réalisés comme décrit dans les paragraphes correspondants.

5 ANALYSE STATISTIQUE

Les données exposées dans cette étude sont exprimées comme moyenne \pm s.d. (pour Standard Deviation) d'au moins trois expériences indépendantes (le nombre d'expériences indépendantes est notée si inférieur à 3). La significativité statistique a été analysée en utilisant le test Mann and Whitney sum rank test en utilisant le logiciel SigmaStat3.1 où $p < 0.05$ est considéré comme statistiquement significatif (signalé par * sur les graphiques) et $p < 0.01$ et $p < 0.001$ sont considérés comme hautement statistiquement significatifs (signalé respectivement par ** et *** sur les graphiques).

ABBREVIATIONS

ABC : ATP-Binding Cassette
ADE : Ara-c, Daunorubicine, Etoposide
ADN : Acide-Desoxyribo-Nucleique
ADP : Adénosine Di-Phosphate
AIC : 5-AminoImidazol-4-Carboxamide
AJCC : American Joint Comitee on Cancer
ALM : Acral Lentiginous Melanoma
AML : leucémie aiguë myéloïde
ARF : ADP Ribosylation Factor
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

BAD : BCL2-Associated agonist of cell Death
BAK : BCL2-Antagonist/Killer
BAX : BCL2-Associated X protein
BCC : Basal Cell Carcinoma
BCL-2 : B-Cell CLL/Lymphoma 2
BCL-XL : B-Cell Lymphoma extra Large
BCRP : Breast Cancer Resistance Protein
BELD : combinaison thérapeutique composée de bléomycine, vindésine, lomustine, dacarbazine
BER : Base Excision Repair
BIM : BCL-2 Interacting Mediator of cell death
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BOLD : combinaison thérapeutique composée de bléomycine, vincristine, lomustine, dacarbazine

CAVE : Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Etoposide
CBDT : combinaison thérapeutique composée de dacarbazine, carmustine, cisplatine, tamoxifène
CDDP : Cis-DiammineCichloroPlatinum (cisplatin)
CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase 2A inhibitor
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CFSE : CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHO : Chinese Hamster Ovary
CHOP : Cyclophosphamide, Hydroxy-daunorubicine, Vincristine, Prednisone
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRIM : Cellules Résistantes Initiatrices de Mélanome
CTLA4: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
CVD : combinaison thérapeutique composée de cisplatin, vinblastine, dacarbazine

DCT : DopaChrome Tautomerase
DIC : Contrast Interférentiel Différentiel
DTIC : Dimethyl-Triazeno-Imidazole-Carboxamide

EMA : European Medicines Agency
ERCC1 : Excision Repair Cross-Complementing 1
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
EST : Expressed Sequence Tag

FDA : Food and Drug Administration
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

GEP : Granulin-Epithelin Precursor
GST : Glutathione S-Tranfêrases

HDAC : Histone DeACétylase
HGF : Hepatocyte Growth Factor

IFN : Interferon
IKB : Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
IL-2 : InterLeukine 2

KO : knock out

LEF1 : Lymphoide Enhancer Factor 1

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

LMM : Lentigo Malignant Melanoma

LS : Longue Survie

MAA : Melanoma Associated Antigen

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCAM/MUC18

MCL-1 : Myeloid Cell Leukemia sequence 1

MCR1 : MelanoCortin Receptor 1

MDR : Multi-Drug Resistance

MEK : MAPK/ERK Kinase

MGMT : O(6)-MethylGuanine-DNA MethylTransférase

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

MLH : MutL Homolog

MMP : Matrix MetalloProteinase

MMR : MisMatch Repair

MRP : Multi-drug Resistance associated Protein

MSH : MutS Homolog

MTIC : Monomethyl Triazene : 5-(3-methyl-1-triazeno)Imidazol-4-Carboxamide

mTOR : mammalian Target Of Rapamycine

MXR : Mithoxantrone Resistance Protein

NBD : Nucleotide Binding Domain

NCI : National Cancer Institut

NER : Nucleotide Excision Repair

NFkB : Nuclear Factor-kB

NK : Natural Killer

NOD/SCID : Non-Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency

NOG : NOD SCID *IL2ry^{null}*

NSG : NOD SCID gamma pour NOD SCID *IL2ry^{tm1Wjl}*

ORF : Open Reading Frame

PAX3 : Paired boX gene 3

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PhIP : 2-amino-1-methyl-6-Phényl-Imidazo[4,5-b]Pyridine

PI3K : PhosphoInositide-3-Kinase

PMEA : 9-(2-PhosphonylMethoxyEthyl)Adenine

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

RB : RetinoBlastoma-related protein

ROS : Reactive Oxygen Species

SCC : Spinal/Squamous Cell Carcinoma

SCF : Stem Cell Factor

SP : Side Population

SSM : Superficial Spreading Melanoma

TCF4 : TranCription Factor 4

TGF : Transforming Growth Factor

TIE-1 : Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains

TMD : TransMembrane Domain

TNM : Tumor Node Metastase (anglais) et Tumeur primaire adéNopathie Métastase (français)

TRP : Tyrosinase Related Protein

VAD : Vincristine, Doxorubicin, Dexamthasone

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

RÉFÉRENCES

A

- Abele, R. and R. Tampe (2004). "The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing." Physiology (Bethesda) **19**: 216-224.
- Abele, R. and R. Tampe (2004). "The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing." Physiology (Bethesda) **19**: 216-224.
- Ackermann, J., M. Fruttschi, et al. (2005). "Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background." Cancer Res **65**(10): 4005-4011.
- Agarwala, S. S. and S. J. O'Day (2011). "Current and future adjuvant immunotherapies for melanoma: blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 as a novel approach." Cancer Treat Rev **37**(2): 133-142.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.
- Albrecht, C. and E. Viturro (2007). "The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases." Pflugers Arch **453**(5): 581-589.
- Aller, S. G., J. Yu, et al. (2009). "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding." Science **323**(5922): 1718-1722.
- Allikmets, R., B. Gerrard, et al. (1996). "Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using Expressed Sequence Tags database." Hum Mol Genet **5**(10): 1649-1655.
- Allikmets, R., L. M. Schriml, et al. (1998). "A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance." Cancer Res **58**(23): 5337-5339.
- Ambudkar, S. V., I. W. Kim, et al. (2006). "The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1)." Eur J Pharm Sci **27**(5): 392-400.
- Ambudkar, S. V., C. Kimchi-Sarfaty, et al. (2003). "P-glycoprotein: from genomics to mechanism." Oncogene **22**(47): 7468-7485.
- Arkenau, H. T., R. Kefford, et al. (2011). "Targeting BRAF for patients with melanoma." Br J Cancer **104**(3): 392-398.
- Armstrong, B. K. and A. Krickler (2001). "The epidemiology of UV induced skin cancer." J Photochem Photobiol B **63**(1-3): 8-18.
- Arozarena, I., H. Bischof, et al. (2011). "In melanoma, beta-catenin is a suppressor of invasion." Oncogene.
- Avril, M. F., S. Aamdal, et al. (2004). "Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study." J Clin Oncol **22**(6): 1118-1125.

B

- Baker, E. K. and A. El-Osta (2004). "MDR1, chemotherapy and chromatin remodeling." Cancer Biol Ther **3**(9): 819-824.

- Balch, C. M., A. C. Buzaid, et al. (2001). "Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma." J Clin Oncol **19**(16): 3635-3648.
- Balch, C. M., J. E. Gershenwald, et al. (2009). "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification." J Clin Oncol **27**(36): 6199-6206.
- Ban, N., Y. Matsumura, et al. (2007). "ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis." J Biol Chem **282**(13): 9628-9634.
- Beaumont, K. A., N. A. Hamilton, et al. (2011). "The recycling endosome protein Rab17 regulates melanocytic filopodia formation and melanosome trafficking." Traffic **12**(5): 627-643.
- Beharry, S., M. Zhong, et al. (2004). "N-retinylidene-phosphatidylethanolamine is the preferred retinoid substrate for the photoreceptor-specific ABC transporter ABCA4 (ABCR)." J Biol Chem **279**(52): 53972-53979.
- Bei, R., L. Marzocchella, et al. (2010). "The use of temozolomide for the treatment of malignant tumors: clinical evidence and molecular mechanisms of action." Recent Pat Anticancer Drug Discov **5**(3): 172-187.
- Berger, W., L. Elbling, et al. (1994). "Intrinsic MDR-1 gene and P-glycoprotein expression in human melanoma cell lines." Int J Cancer **59**(5): 717-723.
- Berger, W., E. Hauptmann, et al. (1997). "Possible role of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chemoresistance of human melanoma cells." Int J Cancer **71**(1): 108-115.
- Bevona, C., W. Goggins, et al. (2003). "Cutaneous melanomas associated with nevi." Arch Dermatol **139**(12): 1620-1624; discussion 1624.
- Bhatia, S., S. S. Tykodi, et al. (2009). "Treatment of metastatic melanoma: an overview." Oncology (Williston Park) **23**(6): 488-496.
- Bogenrieder, T. and M. Herlyn (2002). "Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma." Crit Rev Oncol Hematol **44**(1): 1-15.
- Boiko, A. D., O. V. Razorenova, et al. (2010). "Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271." Nature **466**(7302): 133-137.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.
- Borst, P., C. de Wolf, et al. (2007). "Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5." Pflugers Arch **453**(5): 661-673.
- Botelho, M. G., X. Wang, et al. (2010). "Induction of terminal differentiation in melanoma cells on downregulation of beta-amyloid precursor protein." J Invest Dermatol **130**(5): 1400-1410.
- Brendel, E., M. Ludwig, et al. (2011). "Pharmacokinetic results of a phase I trial of sorafenib in combination with dacarbazine in patients with advanced solid tumors." Cancer Chemother Pharmacol **68**(1): 53-61.
- Broccardo, C., M. Luciani, et al. (1999). "The ABCA subclass of mammalian transporters." Biochim Biophys Acta **1461**(2): 395-404.
- Bryan, J., A. Munoz, et al. (2007). "ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K⁺ channels." Pflugers Arch **453**(5): 703-718.

C

- Callaghan, R., E. Crowley, et al. (2008). "P-glycoprotein: so many ways to turn it on." J Clin Pharmacol **48**(3): 365-378.
- Callaghan, R., R. C. Ford, et al. (2006). "The translocation mechanism of P-glycoprotein." FEBS Lett **580**(4): 1056-1063.

- Camacho, L. H., S. Antonia, et al. (2009). "Phase I/II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma." J Clin Oncol **27**(7): 1075-1081.
- Campioni, M., D. Santini, et al. (2005). "Role of Apaf-1, a key regulator of apoptosis, in melanoma progression and chemoresistance." Exp Dermatol **14**(11): 811-818.
- Carson, W. E. and M. J. Walker, Eds. (2002). Animal Models of Melanoma. Tumor models in cancer research. Totowa, NJ, Human Press Inc.
- Cavadini, P., G. Biasiotto, et al. (2007). "RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload." Blood **109**(8): 3552-3559.
- Ceol, C. J., Y. Houvras, et al. (2008). "Melanoma biology and the promise of zebrafish." Zebrafish **5**(4): 247-255.
- Chandra, P. and K. L. Brouwer (2004). "The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts." Pharm Res **21**(5): 719-735.
- Chapman, P. B., A. Hauschild, et al. (2011). "Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation." N Engl J Med.
- Chapuy, B., R. Koch, et al. (2008). "Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration." Leukemia **22**(8): 1576-1586.
- Chen, K. G., R. D. Leapman, et al. (2009a). "Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity." J Natl Cancer Inst **101**(18): 1259-1271.
- Chen, K. G., G. Szakacs, et al. (2005). "Principal expression of two mRNA isoforms (ABCB 5alpha and ABCB 5beta) of the ATP-binding cassette transporter gene ABCB 5 in melanoma cells and melanocytes." Pigment Cell Res **18**(2): 102-112.
- Chen, K. G., J. C. Valencia, et al. (2009b). "Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **22**(6): 740-749.
- Chen, K. G., J. C. Valencia, et al. (2006a). "Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9903-9907.
- Chen, Z. Q., J. Dong, et al. (2006b). "The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors." J Biol Chem **281**(11): 7452-7457.
- Cheung, S. T., P. F. Cheung, et al. (2011). "Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC)B5 regulate liver cancer cell chemoresistance." Gastroenterology **140**(1): 344-355.
- Chin, L. (2003). "The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man." Nat Rev Cancer **3**(8): 559-570.
- Christmann, M., M. Pick, et al. (2001). "Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT." Int J Cancer **92**(1): 123-129.
- Chu, W., B. J. Pak, et al. (2000). "Tyrosinase-related protein 2 as a mediator of melanoma specific resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II): therapeutic implications." Oncogene **19**(3): 395-402.
- Clevers, H. (2011). "The cancer stem cell: premises, promises and challenges." Nat Med **17**(3): 313-319.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, et al. (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-1654.
- Colone, M., A. Calcabrini, et al. (2008). "The multidrug transporter P-glycoprotein: a mediator of melanoma invasion?" J Invest Dermatol **128**(4): 957-971.
- Cornwell, M. M., T. Tsuruo, et al. (1987). "ATP-binding properties of P glycoprotein from multidrug-resistant KB cells." FASEB J **1**(1): 51-54.
- Crowson, A. N. (2006). "Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications." Mod Pathol **19 Suppl 2**: S127-147.

- Cummins, D. L., J. M. Cummins, et al. (2006). "Cutaneous malignant melanoma." Mayo Clin Proc **81**(4): 500-507.
- Curtin, J. A., J. Fridlyand, et al. (2005). "Distinct sets of genetic alterations in melanoma." N Engl J Med **353**(20): 2135-2147.

D

- Dassa, E. and P. Bouige (2001). "The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms." Res Microbiol **152**(3-4): 211-229.
- Davies, M. A. and Y. Samuels (2010). "Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma." Oncogene **29**(41): 5545-5555.
- de Grouw, E. P., M. H. Raaijmakers, et al. (2006). "Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38⁻ cells." Leukemia **20**(4): 750-754.
- Dean, M. and T. Annilo (2005). "Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates." Annu Rev Genomics Hum Genet **6**: 123-142.
- Deeley, R. G., C. Westlake, et al. (2006). "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins." Physiol Rev **86**(3): 849-899.
- Deichmann, M., M. Thome, et al. (2005). "The chemoresistance gene ABCG2 (MXR/BCRP1/ABCP1) is not expressed in melanomas but in single neuroendocrine carcinomas of the skin." J Cutan Pathol **32**(7): 467-473.
- Delmas, V., F. Beermann, et al. (2007). "Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development." Genes Dev **21**(22): 2923-2935.
- Depeille, P., P. Cuq, et al. (2004). "Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects." Mol Pharmacol **65**(4): 897-905.
- Depeille, P., P. Cuq, et al. (2005). "Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance." Br J Cancer **93**(2): 216-223.
- Dhomen, N., J. S. Reis-Filho, et al. (2009). "Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice." Cancer Cell **15**(4): 294-303.
- Dontu, G., W. M. Abdallah, et al. (2003). "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells." Genes Dev **17**(10): 1253-1270.
- Dou, J., P. Wen, et al. (2009). "Identifying tumor stem-like cells in mouse melanoma cell lines by analyzing the characteristics of side population cells." Cell Biol Int **33**(8): 807-815.
- Doyle, L. A., W. Yang, et al. (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15665-15670.
- Dupin, E., G. Calloni, et al. (2007). "Neural crest progenitors and stem cells." C R Biol **330**(6-7): 521-529.
- Dupin, E. and N. M. Le Douarin (2003). "Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest." Oncogene **22**(20): 3016-3023.

E

- Eggermont, A. M. and C. Robert (2011). "New drugs in melanoma: It's a whole new world." Eur J Cancer **47**(14): 2150-2157.

- Eggermont, A. M., S. Suci, et al. (2008). "Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial." Lancet **372**(9633): 117-126.
- Eichhoff, O. M., A. Weeraratna, et al. (2011). "Differential LEF1 and TCF4 expression is involved in melanoma cell phenotype switching." Pigment Cell Melanoma Res **24**(4): 631-642.
- Eichhoff, O. M., M. C. Zipser, et al. (2010). "The immunohistochemistry of invasive and proliferative phenotype switching in melanoma: a case report." Melanoma Res **20**(4): 349-355.
- Eisen, T., R. Marais, et al. (2011). "Sorafenib and dacarbazine as first-line therapy for advanced melanoma: phase I and open-label phase II studies." Br J Cancer **105**(3): 353-359.
- Elliott, A. M. and M. A. Al-Hajj (2009). "ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome." Mol Cancer Res **7**(1): 79-87.
- Ernst, D. S., E. Eisenhauer, et al. (2005). "Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma." Invest New Drugs **23**(6): 569-575.

F

- Fang, D., T. K. Nguyen, et al. (2005). "A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas." Cancer Res **65**(20): 9328-9337.
- Fecher, L. A., S. D. Cummings, et al. (2007). "Toward a molecular classification of melanoma." J Clin Oncol **25**(12): 1606-1620.
- Fecker, L. F., C. C. Geilen, et al. (2006). "Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis." J Invest Dermatol **126**(6): 1366-1371.
- Ferrandiz-Huertas, C., A. Fernandez-Carvajal, et al. (2011). "Rab4 interacts with the human P-glycoprotein and modulates its surface expression in multidrug resistant K562 cells." Int J Cancer **128**(1): 192-205.
- Finger, R. P., P. Charbel Issa, et al. (2009). "Pseudoxanthoma elasticum: genetics, clinical manifestations and therapeutic approaches." Surv Ophthalmol **54**(2): 272-285.
- Flaherty, K. T., I. Puzanov, et al. (2010). "Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(9): 809-819.
- Florenes, V. A., R. Holm, et al. (1994). "Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas." Cancer Res **54**(2): 354-356.
- Frank, N. Y. and M. H. Frank (2009). "ABCB5 gene amplification in human leukemia cells." Leuk Res **33**(10): 1303-1305.
- Frank, N. Y., A. Margaryan, et al. (2005). "ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma." Cancer Res **65**(10): 4320-4333.
- Frank, N. Y., S. S. Pendse, et al. (2003). "Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter." J Biol Chem **278**(47): 47156-47165.
- Frank, N. Y., T. Schatton, et al. (2011). "VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth." Cancer Res **71**(4): 1474-1485.
- Fuchs, B., H. Ostmeier, et al. (1991). "p-glycoprotein expression in malignant melanoma." J Cancer Res Clin Oncol **117**(2): 168-171.
- Fukunaga-Kalabis, M., G. Martinez, et al. (2010). "Tenascin-C promotes melanoma progression by maintaining the ABCB5-positive side population." Oncogene **29**(46): 6115-6124.

G

- Gaggioli, C. and E. Sahai (2007). "Melanoma invasion - current knowledge and future directions." Pigment Cell Res **20**(3): 161-172.
- Garbe, C., P. Buttner, et al. (1994). "Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society." J Invest Dermatol **102**(5): 695-699.
- Garbe, C., T. K. Eigentler, et al. (2011). "Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects." Oncologist **16**(1): 5-24.
- Garbe, C., K. Peris, et al. (2010). "Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline." Eur J Cancer **46**(2): 270-283.
- Gazzaniga, P., E. Cigna, et al. (2010). "CD133 and ABCB5 as stem cell markers on sentinel lymph node from melanoma patients." Eur J Surg Oncol **36**(12): 1211-1214.
- Gerloff, T., B. Stieger, et al. (1998). "The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver." J Biol Chem **273**(16): 10046-10050.
- Ghajar, C. M., V. Suresh, et al. (2007). "A novel three-dimensional model to quantify metastatic melanoma invasion." Mol Cancer Ther **6**(2): 552-561.
- Ghosh, P. and L. Chin (2009). "Genetics and genomics of melanoma." Expert Rev Dermatol **4**(2): 131.
- Gillet, J. P., T. Efferth, et al. (2007). "Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes." Biochim Biophys Acta **1775**(2): 237-262.
- Gillet, J. P., R. Rutledge, et al. (2009). Characterization of ABCB5, a poorly studied ABC transporter highly expressed in melanoma. 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.
- Girouard, S. D. and G. F. Murphy (2011). "Melanoma stem cells: not rare, but well done." Lab Invest **91**(5): 647-664.
- Gomez, P. F., D. Luo, et al. (2001). "Identification of rab7 as a melanosome-associated protein involved in the intracellular transport of tyrosinase-related protein 1." J Invest Dermatol **117**(1): 81-90.
- Goodell, M. A., K. Brose, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-1806.
- Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, et al. (2007). "Melanoma biology and new targeted therapy." Nature **445**(7130): 851-857.
- Grichnik, J. M. (2008). "Melanoma, nevogenesis, and stem cell biology." J Invest Dermatol **128**(10): 2365-2380.
- Grichnik, J. M., J. A. Burch, et al. (2006). "Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell?" J Invest Dermatol **126**(1): 142-153.
- Grimshaw, M. J., L. Cooper, et al. (2008). "Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells." Breast Cancer Res **10**(3): R52.

H

- Haass, N. K., K. S. Smalley, et al. (2005). "Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma." Pigment Cell Res **18**(3): 150-159.
- Hadnagy, A., L. Gaboury, et al. (2006). "SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations." Exp Cell Res **312**(19): 3701-3710.

- Haffke, M., A. Menzel, et al. (2010). "Structures of the nucleotide-binding domain of the human ABCB6 transporter and its complexes with nucleotides." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 9): 979-987.
- Haldi, M., C. Ton, et al. (2006). "Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish." Angiogenesis **9**(3): 139-151.
- Hall, M. D., M. D. Handley, et al. (2009). "Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity." Trends Pharmacol Sci **30**(10): 546-556.
- Haluska, F. G., H. Tsao, et al. (2006). "Genetic alterations in signaling pathways in melanoma." Clin Cancer Res **12**(7 Pt 2): 2301s-2307s.
- Hansson, J., S. Aamdal, et al. (2011). "Two different durations of adjuvant therapy with intermediate-dose interferon alfa-2b in patients with high-risk melanoma (Nordic IFN trial): a randomised phase 3 trial." Lancet Oncol **12**(2): 144-152.
- Hauschild, A., S. S. Agarwala, et al. (2009). "Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma." J Clin Oncol **27**(17): 2823-2830.
- Heimerl, S., A. K. Bosserhoff, et al. (2007). "Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells." Melanoma Res **17**(5): 265-273.
- Held, M. A., D. P. Curley, et al. (2010). "Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell." Cancer Res **70**(1): 388-397.
- Helmbach, H., M. A. Kern, et al. (2002). "Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency." J Invest Dermatol **118**(6): 923-932.
- Hennessy, M. and J. P. Spiers (2007). "A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter." Pharmacol Res **55**(1): 1-15.
- Herget, M. and R. Tampe (2007). "Intracellular peptide transporters in human--compartmentalization of the "peptidome"." Pflugers Arch **453**(5): 591-600.
- Herlyn, M. and M. Fukunaga-Kalabis (2010). "What is a good model for melanoma?" J Invest Dermatol **130**(4): 911-912.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annu Rev Cell Biol **8**: 67-113.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-723.
- Hoek, K. S., O. M. Eichhoff, et al. (2008). "In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states." Cancer Res **68**(3): 650-656.
- Hoek, K. S., O. M. Eichhoff, et al. (2009). "Stemming the flood." Pigment Cell Melanoma Res **22**(1): 6-7.
- Hoek, K. S. and C. R. Goding (2010). "Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **23**(6): 746-759.
- Houben, R., J. Wischhusen, et al. (2008). "Melanoma stem cells: targets for successful therapy?" J Dtsch Dermatol Ges **6**(7): 541-546.
- Hsu, M. Y., F. E. Meier, et al. (2000). "E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors." Am J Pathol **156**(5): 1515-1525.
- Huang, Y., P. Anderle, et al. (2004). "Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance." Cancer Res **64**(12): 4294-4301.
- Huang, Y. and W. Sadee (2006). "Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells." Cancer Lett **239**(2): 168-182.

Hung, L. W., I. X. Wang, et al. (1998). "Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter." Nature **396**(6712): 703-707.

I

Ichihashi, N. and Y. Kitajima (2001). "Chemotherapy induces or increases expression of multidrug resistance-associated protein in malignant melanoma cells." Br J Dermatol **144**(4): 745-750.

Iwamoto, N., S. Abe-Dohmae, et al. (2006). "ABCA7 expression is regulated by cellular cholesterol through the SREBP2 pathway and associated with phagocytosis." J Lipid Res **47**(9): 1915-1927.

J

Jiang, G., J. N. Zheng, et al. (2011). "Down-regulation of O6-methylguanine-DNA methyl transferase enhances the effect of temozolomide in melanoma cells." Med Hypotheses **76**(1): 147-148.

Jiang, Y. J., Y. Uchida, et al. (2009). "Ceramide stimulates ABCA12 expression via peroxisome proliferator-activated receptor δ in human keratinocytes." J Biol Chem **284**(28): 18942-18952.

Jilaveanu, L. B., S. A. Aziz, et al. (2009). "Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work?" Clin Dermatol **27**(6): 614-625.

Jones, A. L., M. E. O'Brien, et al. (1992). "A randomised phase II study of carmustine alone or in combination with tumour necrosis factor in patients with advanced melanoma." Cancer Chemother Pharmacol **30**(1): 73-76.

Joyce, C., L. Freeman, et al. (2003). "Study of ABCA1 function in transgenic mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(6): 965-971.

Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-162.

K

Kaminski, W. E., J. J. Wenzel, et al. (2001). "ABCA6, a novel a subclass ABC transporter." Biochem Biophys Res Commun **285**(5): 1295-1301.

Keshet, G. I., I. Goldstein, et al. (2008). "MDR1 expression identifies human melanoma stem cells." Biochem Biophys Res Commun **368**(4): 930-936.

Khan, N., M. K. Khan, et al. (2011). "The evolving role of radiation therapy in the management of malignant melanoma." Int J Radiat Oncol Biol Phys **80**(3): 645-654.

Kiebert, G. M., D. L. Jonas, et al. (2003). "Health-related quality of life in patients with advanced metastatic melanoma: results of a randomized phase III study comparing temozolomide with dacarbazine." Cancer Invest **21**(6): 821-829.

Kirkwood, J. M., P. Lorigan, et al. (2010). "Phase II trial of tremelimumab (CP-675,206) in patients with advanced refractory or relapsed melanoma." Clin Cancer Res **16**(3): 1042-1048.

Klein, W. M., B. P. Wu, et al. (2007). "Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma." Mod Pathol **20**(1): 102-107.

- Krishnamurthy, P. C., G. Du, et al. (2006). "Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter." Nature **443**(7111): 586-589.
- Kruh, G. D., Y. Guo, et al. (2007). "ABCC10, ABCC11, and ABCC12." Pflugers Arch **453**(5): 675-684.
- Kuphal, S. and A. Bosserhoff (2009). "Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma." J Pathol **219**(4): 400-409.

L

- La Porta, C. (2009). "Cancer stem cells: lessons from melanoma." Stem Cell Rev **5**(1): 61-65.
- Lage, H. (2008). "An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem." Cell Mol Life Sci **65**(20): 3145-3167.
- Lage, H., M. Christmann, et al. (1999). "Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance." Int J Cancer **80**(5): 744-750.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.
- Larue, L. and F. Beermann (2007). "Cutaneous melanoma in genetically modified animals." Pigment Cell Res **20**(6): 485-497.
- Larue, L. and V. Delmas (2009a). "Secrets to developing Wnt-age melanoma revealed." Pigment Cell Melanoma Res **22**(5): 520-521.
- Larue, L., F. Luciani, et al. (2009b). "Bypassing melanocyte senescence by beta-catenin: a novel way to promote melanoma." Pathol Biol (Paris) **57**(7-8): 543-547.
- Le Douarin, N. M., G. W. Calloni, et al. (2008). "The stem cells of the neural crest." Cell Cycle **7**(8): 1013-1019.
- Lee, C. H. (2010). "Reversing agents for ATP-binding cassette drug transporters." Methods Mol Biol **596**: 325-340.
- Lehne, G., U. H. Grasmö-Wendler, et al. (2009). "Upregulation of stem cell genes in multidrug resistant K562 leukemia cells." Leuk Res **33**(10): 1379-1385.
- Leiter, U., R. M. Schmid, et al. (2000). "Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma." Arch Dermatol Res **292**(5): 225-232.
- Leslie, E. M., R. G. Deeley, et al. (2005). "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense." Toxicol Appl Pharmacol **204**(3): 216-237.
- Levine, E. A., T. A. Holzmayer, et al. (1993). "MDR-1 expression in metastatic malignant melanoma." J Surg Res **54**(6): 621-624.
- Li, Q., Q. Jiang, et al. (2009). "Pseudoxanthoma elasticum: clinical phenotypes, molecular genetics and putative pathomechanisms." Exp Dermatol **18**(1): 1-11.
- Liedert, B., V. Materna, et al. (2003). "Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin." J Invest Dermatol **121**(1): 172-176.
- Lin, J. Y. and D. E. Fisher (2007). "Melanocyte biology and skin pigmentation." Nature **445**(7130): 843-850.
- Lin, K., S. Baritaki, et al. (2010). "The Role of B-Raf Mutations in Melanoma and the Induction of EMT via Dysregulation of the NF-kappaB/Snail/RKIP/PTEN Circuit." Genes Cancer **1**(5): 409-420.

M

- Ma, J. and M. H. Frank (2010a). "Tumor initiation in human malignant melanoma and potential cancer therapies." Anticancer Agents Med Chem **10**(2): 131-136.
- Ma, J., J. Y. Lin, et al. (2010b). "Isolation of tumorigenic circulating melanoma cells." Biochem Biophys Res Commun **402**(4): 711-717.
- Ma, S., S. Egyhazi, et al. (2003). "O6-methylguanine-DNA-methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma." Br J Cancer **89**(8): 1517-1523.
- Mack, J. T., D. M. Townsend, et al. (2007). "The ABCA2 transporter: intracellular roles in trafficking and metabolism of LDL-derived cholesterol and sterol-related compounds." Curr Drug Metab **8**(1): 47-57.
- Margolin, K., J. Longmate, et al. (2005). "CCI-779 in metastatic melanoma: a phase II trial of the California Cancer Consortium." Cancer **104**(5): 1045-1048.
- Marini, A., A. Mirmohammadsadegh, et al. (2006). "Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma." J Invest Dermatol **126**(2): 422-431.
- Marrero, B., J. L. Messina, et al. (2009). "Generation of a tumor spheroid in a microgravity environment as a 3D model of melanoma." In Vitro Cell Dev Biol Anim **45**(9): 523-534.
- Mealey, K. L., S. A. Bentjen, et al. (2001). "Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene." Pharmacogenetics **11**(8): 727-733.
- Middleton, M. R., J. J. Grob, et al. (2000). "Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma." J Clin Oncol **18**(1): 158-166.
- Middleton, M. R., J. M. Lunn, et al. (1998). "O6-methylguanine-DNA methyltransferase in pretreatment tumour biopsies as a predictor of response to temozolomide in melanoma." Br J Cancer **78**(9): 1199-1202.
- Miyake, K., L. Mickley, et al. (1999). "Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes." Cancer Res **59**(1): 8-13.
- Moitra, K., M. Scally, et al. (2011). "Molecular evolutionary analysis of ABCB5: the ancestral gene is a full transporter with potentially deleterious single nucleotide polymorphisms." PLoS One **6**(1): e16318.
- Molinari, A., L. Toccaceli, et al. (2000). "Induction of P-glycoprotein expression on the plasma membrane of human melanoma cells." Anticancer Res **20**(4): 2691-2696.
- Monzani, E., F. Facchetti, et al. (2007). "Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential." Eur J Cancer **43**(5): 935-946.
- Mooney, E. E., J. M. Ruis Peris, et al. (1995). "Apoptotic and mitotic indices in malignant melanoma and basal cell carcinoma." J Clin Pathol **48**(3): 242-244.
- Moran, O. and O. Zegarar-Moran (2008). "On the measurement of the functional properties of the CFTR." J Cyst Fibros **7**(6): 483-494.
- Munoz, M., M. Henderson, et al. (2007). "Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer." IUBMB Life **59**(12): 752-757.

N

- Nazarian, R., H. Shi, et al. (2010). "Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation." Nature **468**(7326): 973-977.
- Nelson, A. A. and H. Tsao (2009). "Melanoma and genetics." Clin Dermatol **27**(1): 46-52.

- Neville, J. A., E. Welch, et al. (2007). "Management of nonmelanoma skin cancer in 2007." Nat Clin Pract Oncol **4**(8): 462-469.
- Ni, Z. and Q. Mao (2011). "ATP-binding cassette efflux transporters in human placenta." Curr Pharm Biotechnol **12**(4): 674-685.
- Nooter, K., A. M. Westerman, et al. (1995). "Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers." Clin Cancer Res **1**(11): 1301-1310.

O

- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-110.
- Ohga, T., T. Uchiumi, et al. (1998). "Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene." J Biol Chem **273**(11): 5997-6000.
- Olsen, C. M., H. J. Carroll, et al. (2010). "Familial melanoma: a meta-analysis and estimates of attributable fraction." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(1): 65-73.
- Oude Elferink, R. P. and C. C. Paulusma (2007). "Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein)." Pflugers Arch **453**(5): 601-610.

P

- Pak, B. J., Q. Li, et al. (2000). "TYRP2-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human melanoma cells is independent of tyrosinase and TYRP1 expression and melanin content." Melanoma Res **10**(5): 499-505.
- Palmieri, G., M. Capone, et al. (2009). "Main roads to melanoma." J Transl Med **7**: 86.
- Park, H. Y., M. Kosmadaki, et al. (2009). "Cellular mechanisms regulating human melanogenesis." Cell Mol Life Sci **66**(9): 1493-1506.
- Passagne, I., A. Evrard, et al. (2006). "O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT) overexpression in melanoma cells induces resistance to nitrosoureas and temozolomide but sensitizes to mitomycin C." Toxicol Appl Pharmacol **211**(2): 97-105.
- Passagne, I., A. Evrard, et al. (2003). "Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by new fotemustine analogs on human melanoma cells in relation to O6-methylguanine DNA-methyltransferase expression." J Pharmacol Exp Ther **307**(2): 816-823.
- Patel, P. M., S. Suciu, et al. (2011). "Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032)." Eur J Cancer **47**(10): 1476-1483.
- Patton, E. E., D. L. Mitchell, et al. (2010). "Genetic and environmental melanoma models in fish." Pigment Cell Melanoma Res **23**(3): 314-337.
- Paytubi, S., X. Wang, et al. (2009). "ABC50 promotes translation initiation in mammalian cells." J Biol Chem **284**(36): 24061-24073.
- Perego, M., M. Tortoreto, et al. (2010). "Heterogeneous phenotype of human melanoma cells with in vitro and in vivo features of tumor-initiating cells." J Invest Dermatol **130**(7): 1877-1886.
- Phan, G. Q., P. Attia, et al. (2001). "Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma." J Clin Oncol **19**(15): 3477-3482.
- Pinon, P. and B. Wehrle-Haller (2011). "Integrins: versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation." Pigment Cell Melanoma Res **24**(2): 282-294.
- Ponti, D., A. Costa, et al. (2005). "Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties." Cancer Res **65**(13): 5506-5511.

- Porras, B. H. and C. J. Cockerell (1997). "Cutaneous malignant melanoma: classification and clinical diagnosis." Semin Cutan Med Surg **16**(2): 88-96.
- Punt, C. J. and A. M. Eggermont (2001). "Adjuvant interferon-alpha for melanoma revisited: news from old and new studies." Ann Oncol **12**(12): 1663-1666.
- Puzanov, I. and K. T. Flaherty (2010). "Targeted molecular therapy in melanoma." Semin Cutan Med Surg **29**(3): 196-201.

Q

- Quintana, E., M. Shackleton, et al. (2010). "Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized." Cancer Cell **18**(5): 510-523.
- Quintana, E., M. Shackleton, et al. (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." Nature **456**(7222): 593-598.

R

- Rae, J. M., C. J. Creighton, et al. (2007). "MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research." Breast Cancer Res Treat **104**(1): 13-19.
- Rambow, F. and L. Larue (2010). "The quest for the melanoma stem cell: still more questions than answers." Pigment Cell Melanoma Res **23**(3): 307-309.
- Ramgolam, K., J. Lauriol, et al. (2011). "Melanoma spheroids grown under neural crest cell conditions are highly plastic migratory/invasive tumor cells endowed with immunomodulator function." PLoS One **6**(4): e18784.
- Rappa, G., O. Fodstad, et al. (2008a). "The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma." Stem Cells **26**(12): 3008-3017.
- Rappa, G., J. Mercurio, et al. (2008b). "Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets." Exp Cell Res **314**(10): 2110-2122.
- Rass, K. and J. C. Hassel (2009). "Chemotherapeutics, chemoresistance and the management of melanoma." G Ital Dermatol Venereol **144**(1): 61-78.
- Refaeli, Y., A. Bhoumik, et al. (2009). "Melanoma-initiating cells: a compass needed." EMBO Rep **10**(9): 965-972.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-115.
- Robert, C. and F. Ghiringhelli (2009). "What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma?" Oncologist **14**(8): 848-861.
- Robert, C., L. Thomas, et al. (2011). "Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma." N Engl J Med **364**(26): 2517-2526.
- Rodnina, M. V. (2010). "Protein synthesis meets ABC ATPases: new roles for Rli1/ABCE1." EMBO Rep **11**(3): 143-144.
- Roesch, A., M. Fukunaga-Kalabis, et al. (2010). "A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth." Cell **141**(4): 583-594.
- Roukos, D. H. (2011). "PLX4032 and melanoma: resistance, expectations and uncertainty." Expert Rev Anticancer Ther **11**(3): 325-328.
- Runger, T. M., S. Emmert, et al. (2000). "Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide." J Invest Dermatol **114**(1): 34-39.

S

- Sampath, J., M. Adachi, et al. (2002). "Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy." AAPS PharmSci **4**(3): E14.
- Santiago-Walker, A., L. Li, et al. (2009). "Melanocytes: from morphology to application." Skin Pharmacol Physiol **22**(2): 114-121.
- Sarkadi, B., L. Homolya, et al. (2006). "Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system." Physiol Rev **86**(4): 1179-1236.
- Sarkadi, B., T. I. Orban, et al. (2010). "Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice?" Stem Cells **28**(1): 174-176.
- Sauna, Z. E. and S. V. Ambudkar (2007). "About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work." Mol Cancer Ther **6**(1): 13-23.
- Schadendorf, D., R. Herfordt, et al. (1995a). "P-glycoprotein expression in primary and metastatic malignant melanoma." Br J Dermatol **132**(4): 551-555.
- Schadendorf, D., A. Makki, et al. (1995b). "Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma." Am J Pathol **147**(6): 1545-1552.
- Schatton, T., G. F. Murphy, et al. (2008). "Identification of cells initiating human melanomas." Nature **451**(7176): 345-349.
- Schatton, T., U. Schutte, et al. (2010). "Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells." Cancer Res **70**(2): 697-708.
- Schmidt, P., C. Kopecky, et al. (2011). "Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(6): 2474-2479.
- Schwartz, G. K., S. Robertson, et al. (2009). A phase I study of XL281, a selective oral RAF kinase inhibitor, in patients (Pts) with advanced solid tumors. 2009 ASCO Annual Meeting J Clin Oncol 27:15s, 2009 (suppl; abstr 3513)
- Scolyer, R. A., G. V. Long, et al. (2011). "Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care." Mol Oncol **5**(2): 124-136.
- Seeger, M. A. and H. W. van Veen (2009). "Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters." Biochim Biophys Acta **1794**(5): 725-737.
- Seetharamu, N., P. A. Ott, et al. (2009). "Novel therapeutics for melanoma." Expert Rev Anticancer Ther **9**(6): 839-849.
- Serrone, L., M. Zeuli, et al. (2000). "Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview." J Exp Clin Cancer Res **19**(1): 21-34.
- Sharma, B. K., V. Manglik, et al. (2010). "Immuno-expression of human melanoma stem cell markers in tissues at different stages of the disease." J Surg Res **163**(1): e11-15.
- Shen, D. W., C. Cardarelli, et al. (1986a). "Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins." J Biol Chem **261**(17): 7762-7770.
- Shen, D. W., A. Fojo, et al. (1986b). "Human multidrug-resistant cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification." Science **232**(4750): 643-645.
- Singh, M., J. Lin, et al. (2008). "Genetics of melanoma tumorigenesis." Br J Dermatol **158**(1): 15-21.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-5828.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Slominski, A., J. Wortsman, et al. (2001). "Malignant melanoma." Arch Pathol Lab Med **125**(10): 1295-1306.

- Smalley, K. S., P. Brafford, et al. (2005). "Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion." Am J Pathol **166**(5): 1541-1554.
- Smalley, K. S. and M. Herlyn (2009). "Integrating tumor-initiating cells into the paradigm for melanoma targeted therapy." Int J Cancer **124**(6): 1245-1250.
- Soengas, M. S., P. Capodiec, et al. (2001). "Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma." Nature **409**(6817): 207-211.
- Sommer, L. (2005). "Checkpoints of melanocyte stem cell development." Sci STKE **2005**(298): pe42.
- Sugimoto, Y. a. K., S. (2007). cloning and expression of human ABCB5, NCBI GenBank.
- Sukhai, M. and M. Piquette-Miller (2000). "Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals." J Pharm Pharm Sci **3**(2): 268-280.
- Svensson, S. P., S. Lindgren, et al. (2003). "Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells." Pigment Cell Res **16**(4): 351-354.
- Swami, U., I. Chaudhary, et al. (2011). "Eribulin-A review of preclinical and clinical studies." Crit Rev Oncol Hematol.
- Szakacs, G., J. P. Annereau, et al. (2004). "Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells." Cancer Cell **6**(2): 129-137.
- Szakacs, G., J. K. Paterson, et al. (2006). "Targeting multidrug resistance in cancer." Nat Rev Drug Discov **5**(3): 219-234.

T

- Taipalensuu, J., H. Tornblom, et al. (2001). "Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers." J Pharmacol Exp Ther **299**(1): 164-170.
- Tarhini, A. A., J. M. Kirkwood, et al. (2007). "Durable complete responses with high-dose bolus interleukin-2 in patients with metastatic melanoma who have experienced progression after biochemotherapy." J Clin Oncol **25**(25): 3802-3807.
- Testori, A., P. Rutkowski, et al. (2009). "Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma." Ann Oncol **20 Suppl 6**: vi22-29.
- Tsao, C. K., S. Seng, et al. (2011). "Clinical development of cabazitaxel for the treatment of castration-resistant prostate cancer." Clin Med Insights Oncol **5**: 163-169.

U

- Uckun, F. M., H. Sather, et al. (1995). "Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia." Blood **85**(4): 873-878.
- Uong, A. and L. I. Zon (2010). "Melanocytes in development and cancer." J Cell Physiol **222**(1): 38-41.

V

- van der Deen, M., E. G. de Vries, et al. (2005). "ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung." Respir Res **6**: 59.

- Vasquez-Moctezuma, I., M. A. Meraz-Rios, et al. (2010). "ATP-binding cassette transporter ABCB5 gene is expressed with variability in malignant melanoma." Actas Dermosifiliogr **101**(4): 341-348.
- Velamakanni, S., S. L. Wei, et al. (2007). "ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles : a brief overview." J Bioenerg Biomembr **39**(5-6): 465-471.
- Villanueva, J., A. Vultur, et al. (2010). "Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K." Cancer Cell **18**(6): 683-695.

W

- Wagle, N., C. Emery, et al. (2011). "Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling." J Clin Oncol **29**(22): 3085-3096.
- Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." EMBO J **1**(8): 945-951.
- Walsh, N., S. Kennedy, et al. (2010). "Membrane transport proteins in human melanoma: associations with tumour aggressiveness and metastasis." Br J Cancer **102**(7): 1157-1162.
- Wanders, R. J., W. F. Visser, et al. (2007). "The peroxisomal ABC transporter family." Pflugers Arch **453**(5): 719-734.
- Wang, S. (2009). "Anchorage-independent growth of prostate cancer stem cells." Methods Mol Biol **568**: 151-160.
- Wang, Y. Y., B. A. Teicher, et al. (1989). "Cross-resistance and glutathione-S-transferase-pi levels among four human melanoma cell lines selected for alkylating agent resistance." Cancer Res **49**(22): 6185-6192.
- Wedge, S. R., J. K. Porteous, et al. (1997). "Effect of single and multiple administration of an O6-benzylguanine/temozolomide combination: an evaluation in a human melanoma xenograft model." Cancer Chemother Pharmacol **40**(3): 266-272.
- Weide, B., T. K. Eigentler, et al. (2011). "Survival after intratumoral interleukin-2 treatment of 72 melanoma patients and response upon the first chemotherapy during follow-up." Cancer Immunol Immunother **60**(4): 487-493.
- Wenzel, J. J., W. E. Kaminski, et al. (2003). "ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter." Biochem Biophys Res Commun **306**(4): 1089-1098.
- Wheatley, K., N. Ives, et al. (2003). "Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials." Cancer Treat Rev **29**(4): 241-252.
- White, R. M. and L. I. Zon (2008). "Melanocytes in development, regeneration, and cancer." Cell Stem Cell **3**(3): 242-252.
- Wilson, B. J., T. Schatton, et al. (2011). "ABCB5 Identifies a Therapy-Refractory Tumor Cell Population in Colorectal Cancer Patients." Cancer Res **71**(15): 5307-5316.
- Wolters, J. C., R. Abele, et al. (2005). "Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the homodimeric ATP binding cassette transporter TAP-like (ABCB9)." J Biol Chem **280**(25): 23631-23636.
- Wong, C. E., C. Paratore, et al. (2006). "Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin." J Cell Biol **175**(6): 1005-1015.
- Wu, C. P., A. M. Calcagno, et al. (2008). "Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies." Curr Mol Pharmacol **1**(2): 93-105.

X

- Xie, S., M. Luca, et al. (1997). "Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis." Cancer Res **57**(11): 2295-2303.
- Xie, T., T. Nguyen, et al. (2009). "Multidrug resistance decreases with mutations of melanosomal regulatory genes." Cancer Res **69**(3): 992-999.

Y

- Yang, J. Y., S. A. Ha, et al. (2010). "p-Glycoprotein ABCB5 and YB-1 expression plays a role in increased heterogeneity of breast cancer cells: correlations with cell fusion and doxorubicin resistance." BMC Cancer **10**: 388.

Z

- Zabierowski, S. E. and M. Herlyn (2008). "Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma." J Clin Oncol **26**(17): 2890-2894.
- Zhang, F., W. Zhang, et al. (2000). "Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes." J Biol Chem **275**(30): 23287-23294.
- Zhuang, L., C. S. Lee, et al. (2007). "Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma." Mod Pathol **20**(4): 416-426.

ANNEXES

ANNEXE 1 : TABLEAU DES DIFFERENTS PHOTOTYPES

Phototype	Couleur des cheveux	Couleur de la peau	Taches de rousseur	Coup de soleil	Aptitude au bronzage
0 (albinos)	Blancs	Blanche	Pas de tache	Constante	Aucune
I	Roux	Laiteuse	Très forte	Constante	Aucune
II	Blonds	Claire	Forte	Très fréquentes	Hâle très léger
III	Chatains	Claire	Moyenne	Très fréquente	Hâle clair
IV	Bruns	Mate	Pas de tache	Rare	Hâle foncé
V	Bruns	Mate	Pas de tache	Exceptionnelle	Hâle très foncé
VI	Noirs	Noire	Pas de tache	aucune	noir

Description des différents phototypes établis sur des critères de couleur des cheveux, de couleur de la peau, de présence de tache de rousseur et de sensibilité à l'exposition solaire.

ANNEXE 2 : TABLEAU DE L'ORGANISATION STRUCTURELLE DES TRANSPORTEURS ABC HUMAINS

Famille	Nom	Alias	Locus	Structure
ABCA	ABCA1	ABC1 , CERP, TGD	9q31.1	TMD1-NBD1-HH1-TMD2-NBD2
	ABCA2	ABC2 , STGD	9q34.3	
	ABCA3	ABC3	16p13.3	
	ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	
	ABCA5	ABC13	17q24.3	
	ABCA6		17q24.3	
	ABCA7	ABCX	19p13.3	
	ABCA8		17q24.3	
	ABCA9		17q24.3	
	ABCA10		17q24.3	
	ABCA11		4p16.3	<i>pseudogène</i>
	ABCA12		2q34	TMD1-NBD1-HH1-TMD2-NBD2
	ABCA13		7p12.3	
	ABCA17		16p13.3	<i>pseudogène</i>
ABCB	ABCB1	MDR1 , P-gp , GP170, ABC20, PGY1, CD243	7q21.1	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCB2	TAP1	6p21.3	TMD0-TMD1-NBD1
	ABCB3	TAP2	6p21.3	TMD0-TMD1-NBD1
	ABCB4	MDR2/3 , PGY3, PFIC3	7q21.1	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCB5		7p21.1	discutée
	ABCB6	ABC14, MTABC3	2q36	mT-TMD1-NBD1
	ABCB7	ABC7, ATM1P	Xq21-q13	mT-TMD1-NBD1
	ABCB8	M-ABC1	7q36.1	mT-TMD1-NBD1
	ABCB9	TAPL	12q24	TMD0-TMD1-NBD1
	ABCB10	MTABC2, M-ABC2	1q42	mT-TMD1-NBD1
	ABCB11	BSEP , PFIC2, SPGP, PYG4, ABC16	2q24	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
ABCC	ABCC1	MRP , MRP1 , ABC29	16p13.1	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC2	MRP2 , CMOAT, ABC30	10q24	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC3	MRP3 , CMOAT2, ABC31	17q22	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC4	MRP4 , MOATB	13q32	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC5	MRP5 , MOATC, ABC33	3q27	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC6	MRP6 , MOATE, ABC34, PXE	16p13.1	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC7	CFTR , MRP7	7q31.3	TMD1-NBD1-R-TMD2-NBD2
	ABCC8	SUR1 , ABC36	11p15.1	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC9	SUR2 , ABC37	12p12.1	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC10	MRP7	6p21.1	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC11	MRP8	16q12.1	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC12	MRP9	16q12.1	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2
	ABCC13	PRED6	21q11.2	<i>pseudogène</i>
ABCD	ABCD1	ALD , ALDP, ABC42	Xq28	TMD1-NBD1
	ABCD2	ALD1, ALDR, ABC39	12q11-q12	TMD1-NBD1
	ABCD3	PXMP1, PMP70, ABC43	1p22-p21	TMD1-NBD1
	ABCD4	PXMP1L, PMP69, ABC41	14q24.3	TMD1-NBD1
ABCE	ABCE1	RLI , RNS41, HP68, RNASEL1	4q31	NBD1-NBD2
ABCF	ABCF1	ABC50	6p21.33	NBD1-NBD2
	ABCF2		7q36	NBD1-NBD2
	ABCF3		3q27.1	NBD1-NBD2
ABCG	ABCG1	WHITE1 , ABC8	21q22.3	NBD1-TMD1
	ABCG2	BCRP , MXR, ABCP, ABC15	4q22	NBD1-TMD1
	ABCG3		8p12	<i>Séquence retirée</i>
	ABCG4	WHITE2	11q23.3	NBD1-TMD1
	ABCG5	WHITE3, Sterolin1	2p21	NBD1-TMD1
	ABCG8	Sterolin2	2p21	NBD1-TMD1

Le détail de l'organisation structurelle ainsi que le positionnement chromosomique des différents transporteurs ABC humains est décrit dans le ci-dessous.

ANNEXE 3 : SEQUENCES DECRITES POUR LES TRANSCRITS DU GENES ABCB5

nchi accession number	Année	Auteur	Tissues
N24315.1	1995	Hiller et al.	melanocytes
H99394.1	1995	Hiller et al.	melanocytes
AI334015.1	1997	Strausberg	pooled human melanocytes, fetal heart and pregnant uterus
AL040763.1	1999	Bloeker et al.	testis
BM471690.1	1999	Strausberg	melanotic melanoma
BX452500.1	2001	Li et al.	adult brain
AF319622.1	2002	Frank et al.	melanoma cancer cell line
BX537763.1	2003	Wambutt et al.	liver
AY234788.1	2003	Frank et al.	epidermal melanocytes
BC044248.1	2003	Strausberg	adult brain, 6 pooled whole brains
AF399931.1	2004	Frank et al.	melanoma
AY090613.1	2004	Frank et al.	G3361 cell line CDDP cisplatin resistant
AY851365.1	2005	Chen et al;	melanoma
AY785909.1	2006	Puetz, Frank and Frank	skin
AY851364.1	2006	Chen et al;	melanoma
BC104920.1	2006	Strausberg	brain, cerebral cortex and lung
BC110370.1	2006	Strausberg	skin, melanotic melanoma
BC104894.1	2007	Strausberg	brain, cerebral cortex and lung
AB353947.1	2007	Sugimoto and Kogure	testis
AY230001.1	2008	Meij et al.	non renseigné
AK127141.1	2008	Tanigami	caudate nucleus (brain)

Les différentes séquences d'ARNm isolées et décrites pour le gène ABCB5 sont présentées dans le tableau.

